

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE OPTICA Y OPTOMETRÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

**Papel biológico del diadenosin tetrafosfato en el ojo: efecto sobre la
composición lacrimal e implicación en la función de barrera corneal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia Loma Lozano

Directores

**Jesús Pintor Just
Ana Isabel Guzmán Aránguez**

Madrid, 2016

Facultad de Óptica y Optometría

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

Universidad Complutense de Madrid



TESIS DOCTORAL

***Papel biológico del diadenosin tetrafosfato en el ojo:
Efecto sobre la composición lagrimal e implicación en la
función de barrera corneal***

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Patricia Loma Lozano

Madrid, 2015

Facultad de Óptica y Optometría

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

Universidad Complutense de Madrid



TESIS DOCTORAL

***Papel biológico del diadenosin tetrafosfato en el ojo:
Efecto sobre la composición lagrimal e implicación en la
función de barrera corneal***

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Patricia Loma Lozano

Bajo la dirección de los doctores:

Jesús Pintor Just y Ana Isabel Guzmán Aránguez

Madrid, 2015



Dº. Jesús Pintor Just, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid y **Dª Ana Isabel Guzmán Aránguez**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA

Que **Dª. Patricia Loma Lozano**, Máster en Óptica, Optometría y Visión por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado “***Papel biológico del diadenosin tetrafosfato en el ojo: Efecto sobre la composición lagrimal e implicación en la función de barrera corneal***”, como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Noviembre de 2015.

Vº Bº DIRECTOR Y CODIRECTORA

Dr. Jesús Pintor Just

Dra. Ana Isabel Guzmán Aránguez

A mis padres, herman@s, y familia.

A tod@s los que me apoyan incondicionalmente.

A Carol.

***“Conozca todas las teorías. Domine todas las técnicas,
pero al tocar un alma humana sea apenas otra alma humana”***

(Carl. G. Jung)

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

Comienzo este apartado dándole las gracias al Dr. Jesús Pintor Just (Suso) por todos estos años transcurridos en el laboratorio, desde mi inicio en 2002 cuando estaba finalizando la carrera, continuando desde 2005 hasta 2010 participando en diversos proyectos, y desde entonces hasta la actualidad con la realización de la presente Tesis Doctoral. Agradecerle plenamente su profesionalidad, apoyo, ayuda, cercanía, sentido del humor y optimismo, así como su acogida en el laboratorio a lo largo de todo este tiempo, el cual ha supuesto para mí un auténtico aprendizaje, además de un bagaje valioso que me llevo para siempre.

Continúo con mi agradecimiento a la Dra. Ana Isabel Guzmán Aránguez, por su buena predisposición y aceptación desde el primer momento para co-dirigirme la presente Tesis Doctoral, aún estando en Boston a miles de kilómetros de distancia. Agradecerle su rigurosidad, enseñanza y profesionalidad en el trabajo realizado, y de manera muy especial en esta última etapa de finalización de tesis, deseándole que disfrute plenamente de algo tan valioso e importante como es la maternidad.

Muy profunda y especialmente quiero agradecerle a la Dra. Assumpta Peral Cerdá (Sunti) por todo el trabajo compartido, por su ofrecimiento, apoyo, fuerza, así como por la profesionalidad y la humanidad que tanto le caracterizan. Siempre lo recordaré.

Doy las gracias a mis compañer@s de laboratorio, especialmente a tod@s los que han brindado su ayuda desprendida. Gracias Alex, Alba, Bego, Mamen, Javieres, Candela, María, Almudena, Fernando y Basilio. Gracias a Hanan, por tus buenas palabras, calidad humana, desprendimiento y ofrecimiento. Y Gonzalo, muchas gracias por tu disposición, ayuda y buen criterio. Agradecer también a Adri, Ana y Maufi, por el tiempo compartido en el que me llevo, aparte de dirigiros vuestro trabajo, muchas risas muy sanas. Gracias a Jesús y a Nacho, por su compañerismo y ayuda. No pueden faltar compañeras que ya no están en el laboratorio, Arancha, Pilar y Conchi, por todos los buenos momentos compartidos, unos más largos, y otros más breves, que siempre permanecerán. Y de manera especial te agradezco, Tere, tu sonrisa constante al abrir la puerta día tras día, así como todos los buenos momentos que hemos compartido, y tu compañerismo, fuerza, calidad humana y amistad.

A continuación quiero tener una mención especial a todas las personas que han estado muy cerca de mí en este recorrido. Personas que me han sabido apoyar, acompañar, y hacer reír, en los mejores y en los peores momentos.

De manera especial te doy las gracias, María. Tu apoyo en esta tesis ha sido un factor clave para poder seguir adelante. No sólo he encontrado en ti una buena compañera, sino también una buena amiga y una mejor persona. Gracias por tu calidad y calidez, por toda tu ayuda, ofrecimiento y por estar siempre ahí, por todos los buenos momentos vividos y compartidos, desde el día de la nieve, hasta la actualidad. GRACIAS por aparecer en mi vida, por lo verdaderamente importante, y que sea para siempre.

GRACIAS a mi grupo interrailero, y a toda la gente de Rivas, por tantos y tantos momentos, conversaciones y VIDA. Te doy las gracias particularmente, Alex, porque desde el principio supe que esta amistad era para toda la vida. Gracias por tu corazón enorme. Has sido, eres y serás siempre un REGALO y una referencia fundamental para mí. Agradecerte mucho también, Raquel, por tanto y tanto compartido, por las mil y una conversaciones acerca de lo verdaderamente importante en esta vida, que es ser “personas buenas, y auténticas”. *“¡¡¡Siempre adelante, como el tren!!!”*.

Estáis muy presentes en mis agradecimientos: Mari Carmen, Marga, Marisa y Marisi. GRACIAS por ser personas tan maravillosas, tan llenas de magia, y tan especiales para mí. GRACIAS de manera especial a Rober, por todos los trayectos recorridos y los que quedan, por tantas conversaciones, ¡porque nos queda mucho por delante!. GRACIAS, Bea y Marijose, por todo lo vivido y aprendido a vuestro lado, que es muchísimo, sois grandes personas: *“¡Equipo, equipo, equipo!”*. GRACIAS a Luis, por todo lo vivido, creado y compartido, y por toda la ayuda que me ofreciste. GRACIAS a Anna, por mostrarme caminos de formación que han cambiado mi vida, por tantas conversaciones de calidad, y por tu manera profunda de entender la vida y el ser humano. Y gracias a todas las personas que habéis hecho posible que algún@s protectos hayan existido y continúen existiendo (Marta, Paula, Bego, Belén, Evelia, etc...).

Quiero agradecer a todas las personas con las que he compartido formación estos últimos años. GRACIAS Ángeles M., Borja, Carmen G., Esther, Inés, Óscar, Paco, Mariate, Norma, Nurieta, Yolanda, Cristina, Virginia, Karin y Raquel. Especialmente, GRACIAS a ti, Carmen B., por todo este recorrido tan valioso, y por estos años de los que me llevo un mensaje clave. Y por supuesto, GRACIAS a todo mi grupo de sabi@s, con l@s que he compartido tres años que difícilmente podrán desaparecer de mi memoria y de mi corazón, por ser tierra fuerte, espejos valiosos, y personas auténticas: Almu, Aroa, Aurora, Axel, Bego, Chus, Clara, Cori, Dani, David,

Eva, Encarna, Francine, Gabriela, Gabriel, Irene, Isa, Isabel, Izaskun, Javi, Julia, Juliana, Lucía, M^ªElena, Nuria, Sonia, Sonsoles, Susana y mi grandísima Toñi. GRACIAS por este tiempo junt@s. No existe la palabra para expresar todo lo que hemos compartido y aprendido, y lo que nos queda.

GRACIAS a tod@s mis amig@s. Y GRACIAS a Lola (porque el mundo sería mejor con más gente como tú) y a Marina (por tu manera especial de tratar a las personas).

GRACIAS de corazón a mis herman@s, Beatriz, Javier y Jose Luis, por ser referencias tan importantes en las que mirarme y apoyarme, por mostrarme vuestra gran calidad como personas, como profesionales y por vuestro tremendo corazón. Agradezco a toda mi familia, a mis sobrinas, tíos, tías, primos, primas y a l@s que ya no est@n entre nosotros. Siempre os voy a llevar conmigo a tod@s.

Especial agradecimiento a Dan y Luna, por tantísimos momentos y por enseñarme tanto, y GRACIAS a toda la familia y amig@s de Carol, por todo su apoyo.

Esta tesis no podría haberla hecho sin tu ayuda, Carol. Te agradezco y agradeceré siempre tu constante apoyo, ayudándome a ver con claridad, a ser mejor persona, a ser mucho más fuerte y a continuar hasta el final. GRACIAS por todo lo que aprendo de ti, día a día, porque eres una persona maravillosa. Porque un@ es mej@r también por la gente de la que se rodea, y lo confirmo contigo. Gracias por hacerme reír tanto, y por ayudarme a ver y vivir lo esencial. Gracias por cada momento vivido, y por todos los que nos quedan por vivir. Ya lo descubrí en la Pedriza, y lo descubro cada día de mi vida. Te estoy eternamente agradecida. *“A más, más”*.

Y finalizo esta sección dándoles las GRACIAS a mis padres, a los cuales dedico la presente Tesis Doctoral. A mi madre, GRACIAS por todo el amor que siempre me has dado, por tu paciencia, y aguante en momentos que no han sido nada fáciles, por estar siempre ahí, y por ser una mujer extraordinaria, con mucha fuerza y experiencia vivida. Por tu humanidad, generosidad y por tu enorme valía. Sobran las palabras. Y a mi padre. Porque no hay día que no me acuerde de ti. GRACIAS por enseñarme lo que significa ser buena persona, buen profesional, y buen padre. Gracias por decirme tanto, sin decirme nada. Por tu corazón enorme. A ti te dedico especialmente todo mi esfuerzo. Te llevo conmigo SIEMPRE. Sobran las palabras.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una Beca/Contrato Predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid.

Abreviaturas



ABREVIATURAS

AJ	<i>Adherens junctions</i> , uniones adherentes
AMPC	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
Ap₃A	P ¹ , P ³ -Di (adenosina-5') trifosfato
Ap₄A	P ¹ , P ⁴ -Di (adenosina-5') tetrafosfato
Ap₅A	P ¹ , P ⁵ -Di (adenosina-5') pentafofosfato
Ap_nA	Diadenosina polifosfatos
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , ácido bicinconínico
BCEC	<i>Bovine corneal endothelial cells</i> , células endoteliales corneales bovinas
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
BPE	<i>Bovine pituitary extract</i> , extracto de pituitaria bovina
CaCl₂	Cloruro de calcio
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio <i>Dulbecco</i> modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC₅₀	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i> , reactivo quimioluminiscente
EDTA	Ácido etilén-diamino tetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERKs	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato
HCLE	<i>Human corneal-limbal epithelial cells</i> , células epiteliales humanas limbocorneales
HPLC	<i>High-pressure liquid chromatography</i> , cromatografía líquida de alta presión
HRP	<i>Horseradish peroxidase enzyme</i> , enzima peroxidasa de rábano

hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i> , telomerasa transcriptasa inversa humana
IP₃	Inositol trifosfato
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i> , molécula de adhesión intercelular
KH₂PO₄	Dihidrógeno fosfato de potasio
K-SFM	<i>Keratinocyte serum free medium</i> , medio para queratocitos libre de suero
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> , proteínas quinasas activadas por mitógenos
MMP	Metaloproteinasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio
Na₃VO₄	Ortovanadato de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NDS	<i>Normal donkey serum</i> , suero de burro
NGS	<i>Normal goat serum</i> , suero de cabra
NP-40	Nonidet [®] P-40 (nonilfenilpolietilen glicol)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino
PDZ	Tipo de dominio proteico. Las siglas PDZ provienen de las iniciales de las tres proteínas que se describieron inicialmente con este dominio (<i>PSD-95; Discs large; Zonula ocludens-1</i>)
PFA	<i>p</i> -formaldehído
PIO	Presión intraocular
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PPADS	Piridoxal fosfato-6-azo (benceno-2', 4'-disulfónico)
PSA	Persulfato de amonio
RB-2	Reactivo azul 2
RIPA	<i>Radio-immunoprecipitation Assay</i> , tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
RT- PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
siRNA	ARN interferente de pequeño tamaño
TBA	Tetrabutyl amonio
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> , resistencia eléctrica transepitelial
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TJ	<i>Tight junctions</i> o uniones estrechas
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
U-0126	1,4-Diamino-2,3-diciano-1,4-bis (2-aminofeniltio) butadieno
UDP	Uridina-5'-difosfato
UTP	Uridina-5'-O-(3-tiotrifosfato)
ZO	<i>Zonula occludens</i>

Índice



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
ÍNDICE.....	23
ÍNDICE DE FIGURAS	31
INDICE DE TABLAS.....	37
RESUMEN.....	41
SUMMARY	45
INTRODUCCIÓN.....	51
1. La superficie ocular.....	51
1.1. Concepto de superficie ocular	51
1.2. La película lagrimal	51
1.3. La córnea	55
1.3.1. Nueva clasificación histológica de la córnea: las seis capas corneales	55
1.3.1.1. Epitelio corneal.....	56
1.3.1.2. Membrana de Bowman o lámina limitante anterior	59
1.3.1.3. Estroma corneal.....	60
1.3.1.4. Capa de Dua.....	62
1.3.1.5. Membrana de Descemet o lámina limitante posterior.....	63
1.3.1.6. Endotelio corneal.....	63
2. Características anatómicas oculares de algunos modelos animales experimentales y su comparación con la córnea humana	64
3. Funciones principales de la córnea.....	68
3.1. Refracción corneal.....	69
3.2. Transparencia corneal, transmisión de la luz.....	69
3.3. Función de respuesta ante agresiones	70
3.4. Función de barrera de la córnea: transporte a través de las rutas transcelular y paracelular	71
4. Sistemas de unión celulares	73
4.1. Estructura y función de las uniones intercelulares	73
4.2. Factores moduladores de las TJ.....	78
4.2.1. Vías de señalización intracelulares	78
4.2.2. Otros agentes que modulan las TJ	82
5. El sistema purinérgico	85
5.1. Receptores P2: P2X y P2Y	85

5.2. Receptores P2 en el ojo	92
5.2.1. Receptores P2 en la superficie ocular	92
5.2.2. Receptores P2 en cámara anterior y posterior	94
5.2.3. Receptores P2 en la retina	95
5.3. Nucleótidos: su identificación en las secreciones oculares	96
5.3.1. Ap ₄ A y su implicación biológica en el ojo	98
5.3.1.1. Estructura de Ap ₄ A	99
5.3.2. Principales funciones biológicas de Ap ₄ A en el ojo	100
5.3.2.1. Papel biológico en la superficie ocular	101
5.3.2.2. Papel biológico de Ap ₄ A en la cámara anterior y posterior del ojo	104
5.3.2.3. Papel biológico de Ap ₄ A en el cristalino	105
5.3.2.4. Papel biológico en la retina	106
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	109
1. Hipótesis	109
2. Objetivos	111
MATERIALES Y MÉTODOS	115
1. Materiales	115
1.1. Reactivos y productos químicos	115
1.2. Tampones utilizados para Western Blot, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica	117
1.3. Anticuerpos empleados en el trabajo experimental	119
1.4. Instrumentación general	120
1.5. Programas, bases de datos y herramientas informáticas empleadas en el trabajo experimental	122
2. Métodos	123
2.1. Modelos experimentales para los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	123
2.1.1. Modelo celular de epitelio corneal humano	123
2.1.1.1. Descongelación de las células	124
2.1.1.2. Cultivo celular y subcultivos	124
2.1.1.3. Conservación de los cultivos celulares	126
2.1.2. Modelos animales	126
2.1.2.1. Modelo de conejo albino de Nueva Zelanda	126
2.1.2.2. Modelos de ratón: C57BL/6 y DBA/2J	127

2.2. Medida de los niveles de lisozima y lactoferrina en lágrima de conejo albino de Nueva Zelanda tras la aplicación tópica de Ap ₄ A.....	127
2.2.1. Tratamientos	127
2.2.1.1. Curso temporal: aplicación tópica de Ap ₄ A 100 µM en diferentes tiempos	127
2.2.1.2. Aplicación tópica de Ap ₄ A a diferentes concentraciones.....	128
2.2.1.3. Ensayos con antagonistas de receptores purinérgicos	128
2.2.2. Medida de los niveles de lisozima en lágrima de conejo mediante difusión en agar tras la aplicación tópica de Ap ₄ A	128
2.2.3. Medida de los niveles de lactoferrina en lágrima de conejo mediante ELISA tras la aplicación tópica de Ap ₄ A.....	129
2.3. Tratamientos de las células de epitelio corneal con distintos agentes	130
2.4. Ensayos de silenciamiento del receptor P2Y ₂ mediante siRNA.....	131
2.5. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial.....	132
2.6. Ensayos de inmunodetección de proteínas en membrana mediante Western Blot..	132
2.6.1. Lisado celular.....	133
2.6.2. Cuantificación de proteínas totales	134
2.6.3. Preparación de las muestras.....	134
2.6.4. Separación electroforética de proteínas (SDS-PAGE)	135
2.6.5. Transferencia e inmunodetección (Western Blot)	136
2.7. Ensayos de inmunocitoquímica	140
2.8. Ensayos de viabilidad celular	140
2.9. Ensayos de espectrofotometría para evaluar el paso de compuestos de distinto peso molecular a través del epitelio corneal	141
2.10. Tratamientos <i>in vivo</i> con distintos agentes	142
2.11. Ensayos de silenciamiento del receptor P2Y ₂ <i>in vivo</i> mediante siRNA	144
2.12. Procedimiento de extracción del humor acuoso	145
2.12.1. Cuantificación de la presencia de compuestos en el humor acuoso mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	146
2.13. Medidas de presión intraocular.....	147
2.14. Evaluación de la salud ocular en el conejo albino de Nueva Zelanda mediante lámpara de hendidura y biomicroscopio especular.....	149
2.15. Inmunohistoquímica: extracciones de córneas montadas en plano y secciones transversales	150
2.15.1. Extracciones de córnea montadas en plano	150
2.15.2. Secciones transversales de córnea	152

2.16. Análisis estadístico de los datos	154
RESULTADOS	157
1. Efecto de Ap ₄ A en los niveles de lisozima y lactoferrina presentes en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda	157
1.1. Efecto de la aplicación tópica de Ap ₄ A 100 µM sobre la lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda	157
1.2. Efecto de la aplicación tópica de Ap ₄ A 100 µM sobre la concentración de lisozima a lo largo del tiempo en lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	159
1.3. Efecto medio del aumento de los niveles de lisozima inducidos por Ap ₄ A en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda	160
1.4. Curva concentración-respuesta tras la aplicación tópica de Ap ₄ A.....	161
1.5. Efecto de antagonistas de los receptores P2 en el aumento de la concentración de lisozima inducida en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda tras la aplicación tópica de Ap ₄ A.....	162
1.6. Efecto de la aplicación tópica de Ap ₄ A 100 µM sobre la concentración de lactoferrina a lo largo del tiempo en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda	163
1.7. Efecto medio del aumento de los niveles de lactoferrina inducidos por Ap ₄ A en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	164
1.8. Curva concentración-respuesta tras la aplicación tópica de Ap ₄ A.....	165
1.9. Efecto de antagonistas de los receptores P2 en el aumento de la concentración de lactoferrina inducida en lágrima tras la aplicación tópica de Ap ₄ A.....	166
2. Estudio del efecto de los dinucleósido polifosfatos y mononucleótidos sobre la permeabilidad de la barrera del epitelio corneal	167
3. Estudio del efecto de Ap ₄ A sobre los niveles proteicos de las proteínas integrantes de las TJ y la fosforilación de ERK	172
3.1. Efecto de Ap ₄ A sobre los niveles proteicos de las TJ a distintos tiempos	172
3.2. Efecto de distintas concentraciones del dinucleótido Ap ₄ A sobre los niveles proteicos de las TJ en células HCLE	175
3.3. Activación de ERK 1/2 tras la aplicación de Ap ₄ A a concentración fija de 100 µM sobre las células HCLE	177
3.4. Evaluación de la implicación del receptor P2Y ₂ y la cascada de señalización ERK 1/2 en el efecto inducido por Ap ₄ A sobre las TJ de células de epitelio corneal humano	180
3.4.1. Análisis de la implicación del receptor P2Y ₂ en el efecto de Ap ₄ A sobre las TJ ...	180
3.4.2. Evaluación de la implicación de la cascada de señalización ERK 1/2 en el efecto inducido por Ap ₄ A sobre las TJ de células HCLE.....	184
4. Ensayos de inmunocitoquímica para evaluar el efecto de Ap ₄ A y UTP sobre la localización de ZO-1 en células HCLE	185

5. Ensayos de viabilidad celular	186
6. Ensayos de espectrofotometría para evaluar la entrada de compuestos de diferente peso molecular a través de células HCLE	187
7. Efecto in vivo del Ap_4A en el modelo de conejo albino de Nueva Zelanda	190
7.1. Preparaciones montadas en plano de córneas de conejos albinos de Nueva Zelanda	190
7.2. Cuantificación de la entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en ausencia o en presencia de Ap_4A . Ensayos de silenciamiento del receptor $P2Y_2$ mediante siRNA	191
7.3. Medidas de presión intraocular en conejos albinos de Nueva Zelanda	194
7.3.1. Efectos de Ap_4A y 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda	194
7.3.2. Efectos combinados de Ap_4A y 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	195
7.3.3. Curva concentración-respuesta de Ap_4A en el efecto hipotensor de 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda	196
7.3.4. Efecto de antagonistas de receptores P2 y de siRNA frente al receptor $P2Y_2$ sobre la acción del Ap_4A en el comportamiento hipotensor de 5-MCANAT.....	197
7.4. Cuantificación de la entrada de agentes adrenérgicos antiglaucomatosos en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en ausencia o en presencia de Ap_4A	198
7.5. Efectos combinados de Ap_4A y agentes adrenérgicos sobre la presión intraocular en conejos albinos de Nueva Zelanda	201
7.5.1. Efectos máximos obtenidos de Ap_4A y agentes adrenérgicos sobre la presión intraocular de conejos albinos de Nueva Zelanda	203
7.6. Evaluación de la salud ocular tras la aplicación tópica del Ap_4A y la instilación de compuestos adrenérgicos en el ojo de conejos albinos de Nueva Zelanda	204
8. Estudio de la implicación del Ap_4A en los cambios corneales observados en un modelo de ratón glaucomatoso	206
8.1. Estudio comparativo a los tres y a los quince meses de edad de los niveles de Ap_4A y de ATP en el humor acuoso de ratones C57BL/6 y DBA/2J	209
8.2. Inmunohistoquímica corneal: secciones transversales y córneas montadas en plano	211
8.2.1. Inmunohistoquímica con secciones transversales de córnea en el modelo de ratón C57BL/6 para analizar la expresión de ZO-1, ocludina y claudina-7	211
8.2.2. Preparaciones de córneas de ratones C57BL/6 y DBA/2J montadas en plano a los tres y quince meses de edad para analizar la expresión de ZO-1 en el endotelio	212
8.3. Estudio comparativo de los niveles proteicos de ZO-1 en córneas de ratones C57BL/6 y DBA/2J a los tres y a los quince meses de edad.....	215

DISCUSIÓN	219
1. Papel biológico de Ap_4A en la protección de la superficie ocular	219
2. Papel biológico de Ap_4A en la función de barrera de la superficie corneal	223
3. Papel biológico de Ap_4A en la mejora de la liberación de agentes hipotensores (5-MCA-NAT y compuestos adrenérgicos) en el interior del ojo.....	232
4. Implicación del Ap_4A en los cambios producidos en el endotelio de un modelo de ratón glaucomatoso (DBA/2J)	239
CONCLUSIONES	247
ANEXO	281

Índice de figuras y tablas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen histológica de la córnea (200 X) que muestra las seis capas corneales: epitelio, membrana de Bowman o lámina limitante anterior, estroma, capa de Dua, membrana de Descemet o lámina limitante posterior, y endotelio.....	56
Figura 2. Capas celulares del epitelio corneal.....	59
Figura 3. (A) Micrografía electrónica de transmisión: Capa de Dua. (B) Inmunohistoquímica mostrando colágeno tipo I (4 X).....	62
Figura 4. Diferencia de espesor entre la córnea central y periférica en un ratón C57BL/6.....	66
Figura 5. Representación esquemática de la función de barrera de la córnea.....	72
Figura 6. Representación esquemática de ocludina.....	75
Figura 7. Representación esquemática de claudina.....	76
Figura 8. (A) Representación esquemática de las TJ. (B) Células endoteliales de ratón unidas mediante zonula ocludens.....	78
Figura 9. Estructura de receptores P2X y P2Y.....	87
Figura 10. Representación de las estructuras de Ap ₄ A.....	100
Figura 11. Papel biológico de Ap ₄ A sobre la fisiología ocular.....	101
Figura 12. Células epiteliales limbocorneales humanas immortalizadas (HCLE).....	123
Figura 13. Sistema de transferencia <i>semi-dry</i>	137

Figura 14. Ensayos de espectrofotometría para determinar los tiempos de equilibrado de las concentraciones de tres colorantes con diferentes pesos moleculares.....	142
Figura 15. Recta de calibrado de Tonopen XL (de uso para humanos).....	148
Figura 16. Curva de calibración de la lisozima e imágenes representativas de los halos de inhibición producidos por la lisozima.....	158
Figura 17. Concentración de lisozima tras la instilación de Ap_4A a lo largo del tiempo en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	159
Figura 18. Estudio comparativo del efecto medio producido por Ap_4A (100 μM) frente a la concentración de lisozima basal de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	160
Figura 19. Curva concentración-respuesta del efecto de Ap_4A sobre los niveles de lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	161
Figura 20. Efecto de un cocktail de antagonistas de los receptores P2 (formado por PPADS, suramina y RB-2, cada uno de ellos a concentración 100 μM) tras la aplicación tópica de Ap_4A (100 μM) en la concentración de lisozima presente en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	162
Figura 21. Concentración de lactoferrina tras la instilación de Ap_4A a lo largo del tiempo en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	164

Figura 22. Estudio comparativo del efecto medio producido por Ap ₄ A (100 µM) y la correspondiente concentración de lactoferrina basal.	165
Figura 23. Curva concentración-respuesta del efecto de Ap ₄ A sobre los niveles de lactoferrina en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	166
Figura 24. Efecto de un cocktail de antagonistas de los receptores P2 (formado por PPADS, suramina y RB-2, cada uno de ellos a concentración 100 µM) tras la aplicación tópica de Ap ₄ A (100 µM) en la concentración de lactoferrina presente en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	167
Figura 25. Medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células HCLE después de su tratamiento con distintos dinucleótidos.....	168
Figura 26. Medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células HCLE después de su tratamiento con distintos mononucleótidos trifosfato.....	170
Figura 27. Medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células HCLE después de su tratamiento con distintos mononucleótidos difosfato.....	171
Figura 28. Efecto de Ap ₄ A sobre los niveles de proteínas constituyentes de las TJ en células HCLE.	173
Figura 29. Cuantificación relativa de las intensidades de banda de la proteína citoplasmática ZO-1 y las proteínas de membrana ocludina y claudina-7.....	174
Figura 30. Efecto de UTP sobre los niveles de proteínas constituyentes de las TJ en células HCLE.	175

Figura 31. Cuantificación relativa de las intensidades de banda de la proteína citoplasmática ZO-1 y las proteínas de transmembrana ocludina y claudina-7.....	176
Figura 32. Efecto de distintas concentraciones del dinucleótido Ap ₄ A sobre los niveles proteicos de ZO-1 en células HCLE.....	178
Figura 33. Efecto de Ap ₄ A sobre la activación de ERK 1/2 en células HCLE.....	179
Figura 34. Niveles proteicos del receptor P2Y ₂ tras el silenciamiento con siRNA en células HCLE.	182
Figura 35. Estudio de la participación de los receptores P2Y ₂ en el efecto de Ap ₄ A sobre las proteínas integrantes de las TJ en células HCLE.....	183
Figura 36. Implicación de la vía de señalización ERK 1/2 en el efecto de Ap ₄ A sobre los niveles de proteínas constituyentes de las TJ en células HCLE.....	184
Figura 37. Inmunolocalización de la proteína ZO-1 tras la aplicación de Ap ₄ A (100 µM) y UTP (100 µM) en las células HCLE.	186
Figura 38. Efecto en la viabilidad celular de Ap ₄ A en células HCLE.....	187
Figura 39. Efecto de Ap ₄ A (100 µM) sobre la entrada de compuestos de diferente peso molecular a través de células HCLE.....	189
Figura 40. Inmunolocalización de la proteína ZO-1 tras la aplicación de Ap ₄ A (10 µM) en córneas de conejos albinos de Nueva Zelanda mediante preparaciones de córneas montadas en plano (40 X).....	191

Figura 41. Entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en combinación con el dinucleótido Ap_4A y en presencia de siRNA frente a $P2Y_2$	192
Figura 42. Entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en combinación con el mononucleótido UTP.....	193
Figura 43. Efectos de Ap_4A y 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	194
Figura 44. Efecto de 5-MCA-NAT aplicado solo y en combinación con Ap_4A sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda.	195
Figura 45. Curva de concentración-respuesta para Ap_4A (0.1 a 500 μM) y 5-MCA-NAT (1 μM) aplicado 2 h después del dinucleótido sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	196
Figura 46. Efecto de antagonistas de los receptores P2 y siRNA frente a $P2Y_2$ en el efecto potenciador de Ap_4A sobre la acción hipotensora inducida por 5-MCA-NAT.....	198
Figura 47. Entrada de agentes adrenérgicos (brimonidina) en combinación con Ap_4A sobre el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda.	200
Figura 48. Efecto de agentes adrenérgicos (timolol) en combinación con Ap_4A sobre el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda.....	200
Figura 49. Efecto de agentes adrenérgicos (brimonidina) en combinación con Ap_4A sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda.	201
Figura 50. Efecto de agentes adrenérgicos (timolol) en combinación con Ap_4A sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda.	202

Figura 51. Comparación entre los efectos máximos obtenidos en la reducción de PIO tras la aplicación de brimonidina y timolol con o sin Ap_4A observados 3 h después de la aplicación del dinucleótido.....	203
Figura 52. Evaluación de la salud ocular general de los conejos albinos de Nueva Zelanda tras la aplicación de los diferentes compuestos.....	205
Figura 53. Medidas de presión intraocular en ratones C57BL/6 y DBA/2J, a diferentes estadios: tres meses, nueve meses y quince meses de edad.....	207
Figura 54. Alteraciones en la córnea del ratón DBA/2J.....	208
Figura 55. (A) Perfiles de HPLC representativos de ATP y de Ap_4A en ratones C57BL/6 de tres y quince meses de edad y (B) en ratones DBA/2J de tres y quince meses de edad. (C) Cuantificación de los cromatogramas descritos en el panel A.....	210
Figura 56. Inmunolocalización de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-7 en la córnea de ratones C57BL/6 de tres meses de edad.....	211
Figura 57. Inmunolocalización de ZO-1 en preparaciones de córneas montadas en plano de ratones C57BL/6 y DBA/2J de tres meses de edad.....	213
Figura 58. Inmunolocalización de ZO-1 en preparaciones de córneas montadas en plano de ratones C57BL/6 y DBA/2J de quince meses de edad.....	214
Figura 59. Cambios en los niveles de ZO-1 en la córnea de ratones C57BL/6 y DBA/2J de tres y quince meses de edad.	215
Figura 60. Mecanismo de acción de Ap_4A sobre la función de barrera corneal.....	231

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudio comparativo de algunos de los parámetros oculares en humano, conejo y ratón	68
Tabla 2. Ejemplos de efectos inducidos por las MAPK sobre las TJ en distintas localizaciones oculares	81
Tabla 3. Receptores P2X homoméricos: principales agonistas, antagonistas y perfiles farmacológicos de los diadenosina polifosfatos.....	90
Tabla 4. Receptores P2Y (principales agonistas, antagonistas, y perfiles farmacológicos de los diadenosina polifosfatos.	91
Tabla 5. Receptores purinérgicos presentes en la superficie ocular.	93
Tabla 6. Relación de los principales reactivos y compuestos químicos utilizados.....	115
Tabla 7. Relación de los tampones utilizados	117
Tabla 8. Listado de anticuerpos utilizados	119
Tabla 9. Relación de los equipos e instrumentación general	120
Tabla 10. Relación de los programas, bases de datos y herramientas informáticas empleadas en el trabajo experimental	122
Tabla 11. Secuencia de siRNA para estudios in vivo	145
Tabla 12. Condiciones experimentales para la cuantificación de la entrada de compuestos en el humor acuoso mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	147

Resumen



RESUMEN

El Ap₄A es una molécula con un amplio papel biológico en el ojo. Se ha descrito su implicación en procesos de secreción lagrimal, cicatrización epitelial, regulación de la presión intraocular, y presenta también un papel neuroprotector sobre los terminales simpáticos que inervan el cuerpo ciliar.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la participación del Ap₄A en otras posibles funciones a nivel ocular. En concreto se ha estudiado la capacidad de este dinucleótido para estimular la liberación de proteínas lagrimales de acción antibacteriana tales como la lisozima y la lactoferrina. Por otra parte se ha investigado su efecto como modulador de la función de barrera de la córnea a través de la regulación de los niveles de expresión de proteínas constituyentes de las *tight junctions* (TJ). Dicho efecto sobre la barrera puede tener una importante repercusión en la entrada de fármacos y en la consiguiente eficacia terapéutica de los mismos. Por último, se ha estudiado la posible implicación del dinucleótido en el proceso de edematización descrito en modelos animales glaucomatosos tales como el ratón DBA/2J.

Con el objetivo de averiguar si la activación de Ap₄A inducía un efecto sobre la producción de dos proteínas antimicrobianas relevantes de la lágrima (lisozima y lactoferrina) se realizaron ensayos en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda, mediante las técnicas de agar-agar y ELISA. Los resultados obtenidos demostraron que Ap₄A produce un aumento en la concentración de lisozima y de lactoferrina del 93% y 24%, respectivamente, frente a valores basales, y este efecto está mediado por receptores de tipo P2. Teniendo en cuenta la acción antibacteriana ejercida por dichas

proteínas, este resultado sugiere que la aplicación tópica de Ap₄A contribuiría a reforzar la protección frente a potenciales infecciones de la superficie ocular.

Por otra parte se ha examinado el efecto que ejerce el Ap₄A sobre la función de barrera del epitelio corneal. Con tal fin, se realizaron ensayos *in vitro* analizando la posible modificación de la permeabilidad de la barrera epitelial corneal mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), obteniéndose una reducción del 68% 2 h después de la aplicación de Ap₄A, indicando un aumento en la permeabilidad paracelular. Este descenso en los valores de TEER sugirió la existencia de alguna alteración en la localización y/o expresión proteica de las TJ. Por ello se evaluaron mediante Western Blot los potenciales cambios en tres de las proteínas constituyentes de las mismas (ZO-1, ocludina y claudina-7) en células de epitelio corneal humano. La aplicación de Ap₄A durante cinco minutos indujo una disminución en los niveles de éstas proteínas, detectándose una reducción de aproximadamente 59% para la proteína ZO-1, 57% de descenso en el caso de ocludina y un 58% de reducción para claudina-7 transcurridas dos horas del tratamiento con el dinucleótido. Este efecto del Ap₄A sobre las TJ parece estar mediado por receptores P2Y₂ y la vía de señalización de las proteínas ERK 1/2, hallazgo que se dedujo mediante ensayos de silenciamiento con RNAs de interferencia frente al receptor P2Y₂ y el empleo de antagonistas específicos para esta ruta de señalización.

Asimismo tanto en el cultivo de células de epitelio corneal humano como en las preparaciones en plano de córneas de conejo los estudios de inmunofluorescencia revelaron una clara disminución del marcaje de la proteína ZO-1 tras la aplicación tópica de Ap₄A.

Estos resultados condujeron a la evaluación en ensayos *in vivo* mediante conejos albinos de Nueva Zelanda para analizar si el incremento en la permeabilidad de la barrera inducido por Ap₄A podría facilitar el acceso de fármacos al interior del ojo. En concreto, se ha analizado la presencia de compuestos antiglaucomatosos (como el análogo de la melatonina 5-MCA-NAT y de los fármacos adrenérgicos brimonidina y timolol) en el humor acuoso de conejos. Cuando se instiló Ap₄A 2 h antes del tratamiento con los fármacos fue posible detectar un incremento en los niveles de los compuestos en el humor acuoso, con respecto a los niveles correspondientes a la aplicación de los fármacos solos. Además, la aplicación tópica del dinucleótido 2 h antes aumentó el efecto hipotensor de dichos fármacos.

Por último, considerando la acción que el Ap₄A ejerce en las TJ y en la formación de la barrera en el epitelio corneal, se ha investigado si este compuesto podría también estar implicado en los posibles cambios subyacentes en estas proteínas en situaciones patológicas que afectan a la función de barrera del endotelio corneal y que conducen a un proceso de edematización en la córnea. Para ello se evaluaron, mediante HPLC, los niveles de este dinucleótido en el humor acuoso de ratones glaucomatosos DBA/2J, caracterizados por presentar un proceso de edematización corneal, y de ratones sanos C57BL/6. Concretamente, se emplearon dos estadios diferentes en ambos modelos de ratón: un estadio de 3 meses en ausencia de patología y otro de 15 meses con la patología avanzada. Estos estudios demostraron niveles elevados de Ap₄A en el ratón DBA/2J a los quince meses en comparación con el ratón control C57BL/6 y con respecto al estadio de 3 meses del modelo patológico. Asimismo, a los 15 meses de edad se detectó una alteración en la expresión de ZO-1, así como una reducción significativa de los niveles proteicos de dicha proteína en comparación con el ratón control C57BL/6 (39%) y con respecto al estadio de 3 meses del ratón DBA/2J (55%).

A modo de conclusión, Ap₄A puede reforzar la acción antimicrobiana de la lágrima al incrementar los niveles de dos proteínas bactericidas clave como son la lisozima y la lactoferrina. Por otra parte, Ap₄A regula la función de barrera corneal al inducir cambios en los niveles de proteínas integrantes de las TJ epiteliales. Como consecuencia de estos cambios aumenta la permeabilidad de la barrera, lo que facilita el acceso de fármacos antiglaucomatosos al interior del ojo, mejorando el efecto hipotensor de los mismos. Por último, Ap₄A podría estar implicado en el proceso de edematización observado en el ratón DBA/2J.

SUMMARY

Ap₄A is a molecule with a wide biological role in the eye. It is involved in processes such as tear secretion, epithelial healing, intraocular pressure regulation, and it has a neuroprotective role on the sympathetic nerve terminals that innervate the ciliary body.

The aim of this work has been to analyze Ap₄A participation in other possible functions in the eye. Particularly, Ap₄A ability to stimulate the release of some bactericidal tear proteins, such as lysozyme and lactoferrin has been studied. Also, its effect as a modulator in the corneal barrier function through the regulation of *tight junctions* (TJ) protein levels has been analyzed. This effect on the corneal barrier may have a significant impact on the delivery of drugs and in their consequent therapeutic efficacy. Finally, the possible involvement of the dinucleotide in the corneal edema process described in glaucomatous animal models such as the DBA/2J mouse has been investigated too.

In order to know if the Ap₄A activation induced an effect on the bactericidal production of two relevant antimicrobial tear proteins (lysozyme and lactoferrin), assays have been conducted using the tears of New Zealand white rabbits, by means of agar-agar and ELISA techniques. The results obtained showed that Ap₄A produced an increase in the concentration of lysozyme and lactoferrin (93% and 24%, respectively) compared to baseline, effects mediated by P2 receptors. Considering the antibacterial action exerted by these proteins, these results suggest that topical application of Ap₄A would contribute to reinforce the protection against potential infections of the ocular surface.

Moreover, the effect that Ap₄A had on the barrier function of the corneal epithelium was analyzed. With this aim, *in vitro* assays analyzing the possible modification of the corneal epithelial barrier permeability by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) was made, obtaining a reduction of 68% 2 h after Ap₄A application, indicating an increment in the paracellular permeability. This decrease in TEER values suggested the existence of possible alterations in the localization and/or protein expression of TJ. Therefore, the potential changes in three TJ proteins (ZO-1, occludin and claudin-7) in human corneal epithelial cells were evaluated by Western blotting. Application of Ap₄A for five minutes induced a decrease in the levels of these proteins, with a reduction of about 59% for ZO-1, 57% for occludin and 58% for claudin-7 two hours after the treatment with the dinucleotide. This Ap₄A effect on the TJ occur through P2Y₂ receptor activation activating ERK 1/2 signaling pathway stimulation. These findings were verified by silencing assays with specific interfering RNAs against this receptor and the use of specific antagonists for the mentioned signaling pathway.

Likewise, *in vitro* and *in vivo* whole-mount immunofluorescence studies showed a clear disruption of ZO-1 distribution protein after topical application of Ap₄A.

These results led us to examine if the increase in barrier permeability induced by Ap₄A could facilitate the access of drugs into the eye by means of *in vivo* assays with New Zealand white rabbits. Specifically, the presence of antiglaucomatous compounds (such as the melatonin analogue 5-MCA-NAT and the adrenergic drugs brimonidine and timolol) in the rabbit aqueous humor was evaluated. When Ap₄A was topically applied 2 h before drug instillation, increased levels of these compounds in the aqueous humor were found, compared with the application of the drug alone. Topical

application of Ap₄A 2 h before increased the hypotensive effect of these compounds too.

Finally, considering the action that Ap₄A exerted on the TJ and barrier formation on the corneal epithelium, it was investigated if this compound could also be involved in the possible underlying changes in these proteins in pathological situations affecting the corneal endothelial barrier function that can induce corneal edema. For this purpose, the levels of this dinucleotide in the aqueous humor of glaucomatous DBA/2J mice, that show corneal edema, and in C57BL/6 healthy mice were evaluated by HPLC. Two different ages of these mouse models were used, a 3 months, in the absence of pathology and a 15 months when the disease has been fully established. These studies showed high levels of this dinucleotide in DBA/2J mice at fifteen months compared to its C57BL/6 control mice as well as compared to 3 months of age in the DBA/2J model. Also, in the advanced 15 months DBA/2J stage, an altered ZO-1 staining pattern and a significant reduction in the protein levels compared to control C57BL/6 mice (39%) as well as compared to the 3 months DBA/2J mice (55%) were found.

In conclusion, Ap₄A can reinforce the antimicrobial action of tears since it increases the levels of two antimicrobial key proteins such as lysozyme and lactoferrin. Furthermore, Ap₄A regulates the corneal barrier function by inducing changes in epithelial TJ protein levels. As a result of these changes, this compound increases the permeability of the corneal barrier, which facilitates the access of antiglaucoma drugs into the eye, improving its hypotensive effect. Finally, Ap₄A could be involved in the edema process observed in the DBA/2J mice.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. La superficie ocular

1.1. Concepto de superficie ocular

La superficie ocular es una unidad funcional formada por la superficie y el epitelio glandular de la córnea, la conjuntiva, las glándulas lagrimales principal y accesorias, los párpados y sus glándulas (Meibomio, Moll y Zeis) y el conducto nasolagrimal. Todos los componentes de dicho sistema están vinculados funcionalmente por la continuidad de los epitelios, por la inervación, y por los sistemas endocrino, vascular e inmunológico (Gipson, 2007). Dichas estructuras actúan entre sí, produciendo una homeostasis a modo de sistema de mantenimiento y defensa del ojo, conservando un epitelio corneal íntegro, una superficie de refracción corneal lisa y una película lagrimal estable que lo protege del exterior. La pérdida de dicho comportamiento homeostático, y por tanto la disfunción de la superficie ocular, produce manifestaciones clínicas muy variadas, como por ejemplo ojo seco, queratitis infecciosas, queratoconjuntivitis alérgicas, así como lesiones químicas y defectos epiteliales (Leong *et al.*, 2015).

1.2. La película lagrimal

Con su compleja mezcla de proteínas, lípidos, hidratos de carbono y electrolitos la película lagrimal cubre la córnea y la conjuntiva bulbar y palpebral, presentando varias funciones importantes: proporcionar lubricación y humedecer la córnea, evitar la desecación del epitelio de la superficie ocular, ayudar a proporcionar una superficie lisa para que la luz se refracte, servir de suministro de oxígeno a la córnea, y proporcionar protección contra una variedad de patógenos potenciales. Tiene unas 7

µm de espesor, siendo variable debido a su naturaleza fluida y al parpadeo (Montes-Mico, 2007; McDermott, 2013).

La película lagrimal se dividía clásicamente en tres capas (lipídica, acuosa y mucínica). Actualmente, no se considera como un triestado de lípidos, agua y mucinas, sino como una capa acuosa-mucínica (que contiene una mezcla de mucinas, glicoproteínas, y diferentes componentes acuosos tales como electrolitos y glucosa, junto con otras proteínas como lisozima y lactoferrina, entre otras) con una capa lipídica (producida por las glándulas de Meibomio) flotando sobre ella (Society, 2007; Cher, 2012). La fase acuosa deriva principalmente de la glándula lagrimal principal, pudiendo también contribuir a su secreción la conjuntiva. Las células caliciformes conjuntivales, así como las células epiteliales corneales y de la conjuntiva, proporcionan el componente mucínico (Murube, 2012). La superficie epitelial del ojo está expuesta continuamente a patógenos potenciales, de los cuales se defiende debido en gran parte a la película lagrimal, que contiene un número de componentes antimicrobianos los cuales se renuevan durante el lagrimeo y son capaces de producir la muerte de los patógenos o al menos inhibir su replicación. Las principales proteínas que forman parte de la lágrima son la lisozima, la lactoferrina, la inmunoglobulina secretora A (slgA), la albúmina de suero, y la lipocalina lagrimal (Kijlstra *et al.*, 1994).

Alexander Fleming fue el primero en demostrar en lágrima humana la presencia de lisozima, la cual presenta acción bactericida frente a bacterias Gram-positivas, como *Micrococcus lisodeikticus*, al catalizar la hidrólisis de las uniones 1,4-beta entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina de la cadena principal de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana (Fleming, 1922; Qasba *et al.*, 1997). La lisozima es secretada por las glándulas lagrimales principales y accesorias, representando entre un 20% y un 30% aproximadamente de las proteínas totales

presentes en las lágrimas basales y reflejas (Aho *et al.*, 1996; Sack *et al.*, 2001; Albert, 2008). En el reino animal se han identificado tres tipos principales de lisozima distintas: la de tipo c (convencional o de pollo), la de tipo g (de ganso) y lisozima de tipo i (de invertebrados) (Callewaert *et al.*, 2010), las cuales difieren en sus secuencias de aminoácidos, así como en sus propiedades bioquímicas y enzimáticas. La lisozima de tipo c ha servido como modelo para estudios sobre la estructura y función de la enzima (lisozima de clara de huevo de gallina (*Hen egg white lysozyme* o *HEWL*)). Dicho tipo de lisozima es producida por la mayoría de los vertebrados, incluyendo mamíferos. La lisozima humana fue la primera lisozima de mamífero secuenciada y, junto con *HEWL*, sirvió como proteína modelo para una amplia variedad de estudios (Peters *et al.*, 1989; Prager, 1996; Prager *et al.*, 1996). Estudios recientes realizados en lágrima humana detectaron valores de concentración de lisozima c de 3.06 ± 1.07 mg/ml (Versura *et al.*, 2013).

La lactoferrina lagrimal, descubierta por Masson en 1966 (Masson *et al.*, 1966) se produce en las células acinares de la glándula lagrimal, y está presente en las lágrimas normales de mamíferos incluyendo los seres humanos (Gillette *et al.*, 1980), el ganado y los bisontes (Pinard *et al.*, 2003), conejos, perros, gatos, ratones, koalas (Hemsley *et al.*, 2000) y cobayas (Boonstra *et al.*, 1987). La lactoferrina posee actividades antiinflamatorias y antimicrobianas, desempeñando un papel esencial en el mantenimiento de la salud ocular (Arnold *et al.*, 1977; Conneely, 2001; Flanagan *et al.*, 2009). Constituye aproximadamente entre el 20% y el 30% del total de las proteínas lagrimales basales y reflejas (Janssen *et al.*, 1983; Sack *et al.*, 2001) siendo su concentración media en la lágrima humana de, aproximadamente, 2.11 ± 0.74 mg/ml (Versura *et al.*, 2013). La lactoferrina de la lágrima está constituida por dos regiones simétricas, poseyendo cada una de ellas un receptor (galactosa-manosa-fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico) del hierro, con capacidad de unir reversiblemente

una molécula de hierro férrico (Fe^{3+}). El hierro es fundamental para el metabolismo y desarrollo de las bacterias, así como para su supervivencia y efecto patogénico, y la lactoferrina reduce la disponibilidad de las bacterias a dicho mineral, limitando así el desarrollo bacteriano (Kijlstra, 1990).

Además, también presenta una acción bactericida directa siendo capaz de destruir diferentes microorganismos por un mecanismo distinto del secuestro de hierro, produciendo alteraciones en la permeabilidad de la membrana bacteriana que conducen a la pérdida de su integridad. Se cree que, en general, la lactoferrina tiene un papel microbiostático en lugar de microbicida en fluidos biológicos tales como la lágrima (Alexander *et al.*, 2012). La disminución de los niveles de lactoferrina se asocia a una disminución de la producción de la glándula lagrimal principal (Danjo *et al.*, 1994). Se han reportado niveles reducidos de lactoferrina lagrimal en patologías tales como ojo seco (Mackie *et al.*, 1984; Versura *et al.*, 2010), tracoma (Rapacz *et al.*, 1988), conjuntivitis vernal, conjuntivitis papilar gigante inducida por lentes de contacto (Ballow *et al.*, 1987) y cirugía post-operatoria de cataratas (Jensen *et al.*, 1985).

Existen otros componentes lagrimales con propiedades antimicrobianas (McDermott, 2013), como son la proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (*Bactericidal/permeability-increasing protein*, o BPI) (Peuravuori *et al.*, 2006; Holweg *et al.*, 2011), las mucinas (Paulsen *et al.*, 2006; Spurr-Michaud *et al.*, 2007; Mantelli *et al.*, 2008), los péptidos antimicrobianos (Garreis *et al.*, 2011) o la lipocalina (Sack *et al.*, 2001; Albert, 2008), entre otros.

1.3. La córnea

La córnea es una estructura transparente del ojo cuyas capacidades refractivas, biomecánicas y de barrera permiten la interacción con el medio exterior. Se trata del tejido ocular que está sometido a un mayor estrés mecánico, de ahí su alto contenido en colágenos fibrilares. Es un tejido heterogéneo (debido a los diferentes materiales que la componen) y anisótropo (por la disposición peculiar de sus fibras) (Peris, 2014). La córnea forma la capa fibrosa del globo ocular, uniendo la esclera con el limbo esclerocorneal. Es una estructura avascular, altamente innervada (Shaheen *et al.*, 2014), que se nutre del humor acuoso, de la película lagrimal y de los capilares limbares, y que elimina los productos de desecho (como el CO₂ y otros) a través del endotelio, de la cámara anterior, o de los vasos limbares (Krachmer, 2011).

1.3.1. Nueva clasificación histológica de la córnea: las seis capas corneales

Microscópicamente, la córnea ha sido estructurada tradicionalmente en cinco capas: epitelio, membrana de Bowman o lámina limitante anterior, estroma, membrana de Descemet o lámina limitante posterior, y endotelio. Investigaciones recientes han demostrado la existencia de una nueva capa corneal entre el estroma de la córnea y la membrana de Descemet, a la que han denominado “Capa de Dua”, propuesta en 2013 por Harminder Dua (Universidad de Nottingham) (Figuras 1 y 3).

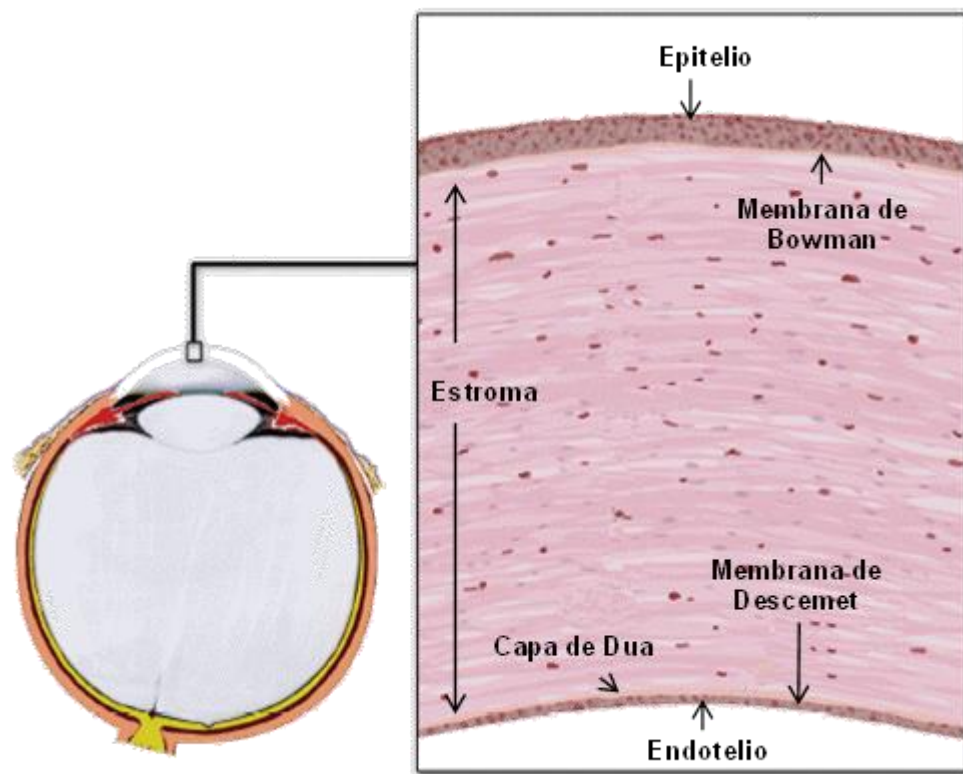


Figura 1. Imagen histológica de la córnea (200 X) que muestra las seis capas corneales: epitelio, membrana de Bowman o lámina limitante anterior, estroma, capa de Dua, membrana de Descemet o lámina limitante posterior, y endotelio. Imagen obtenida de Fernandez *et al.*, 2008.

1.3.1.1. Epitelio corneal

La superficie epitelial de la córnea supone la primera barrera respecto al exterior y es una parte integral de la interfaz formada entre la córnea y la película lagrimal, crítica para la función refractiva del ojo. Se trata de una capa de células pluriestratificadas y no queratinizadas, con un espesor de 50 a 60 μm (Knupp *et al.*, 2009) caracterizada por una extrema uniformidad de limbo a limbo, y constituye aproximadamente el 10% del grosor corneal total. El epitelio corneal contiene entre 5 y 7 capas celulares bien diferenciadas en la parte central, aumentando a 8 y 10 capas en la zona periférica. El epitelio corneal se recambia constantemente, aproximadamente en una semana, por descamación de las células superficiales (Thoft *et al.*, 1983). Las células epiteliales pueden dividirse morfológicamente en tres grupos,

agrupadas por estratos. Del estrato más interno al más externo, consta de una única capa interna de células basales (o columnares), una capa de células intermedias (o alares) y por último una tercera capa en la superficie de células escamosas, planas o apicales. Entre todas ellas existen unas uniones intercelulares muy desarrolladas con membranas celulares interdigitadas, microproyecciones (*microvilli*) y uniones estrechas o *tight junctions* (TJ), que le confieren una gran estabilidad al epitelio, y ejercen a su vez de barrera anatómica.

Las células basales o columnares

Se encuentran en la capa más profunda del epitelio, tienen aspecto poligonal, y son más alargadas vertical que horizontalmente. Su origen se encuentra en las células amplificadoras transitorias del limbo esclerocorneal. Se trata de las únicas células del epitelio que son activas mitóticamente, diferenciándose y moviéndose apicalmente para convertirse en una célula intermedia, y posteriormente escamosa, antes de ser eliminadas por la película lagrimal. Este proceso tiene una duración de 7 a 14 días (Hanna *et al.*, 1961; Wiley *et al.*, 1991). Asimismo, y al igual que otros epitelios, las células basales se unen entre sí utilizando microestructuras que además tienen un papel de comunicación y formación de barreras. Son fundamentalmente tres los distintos tipos de microestructuras que las unen: 1) Desmosomas, los cuales son interdigitaciones entre las superficies celulares, con varios componentes moleculares propios; 2) TJ, que suponen una importante barrera intercelular impenetrable a microorganismos y prácticamente impermeable a fluidos, electrolitos y otras macromoléculas y 3) Uniones gap comunicantes (*gap junctions*), que forman canales de iones y moléculas hidrofílicas. Las células basales contienen también tonofilamentos para mantener la forma celular. Las células basales del epitelio corneal se unen a una membrana basal que ellas mismas producen, por medio de unos

complejos de adhesión, que constituyen los hemidesmosomas, los cuales se fijan a fibrillas de anclaje situadas en la membrana basal, compuestas por colágeno VII, y que penetran en la estructura del estroma (Krachmer, 2011), finalizando en placas localizadas compuestas por colágeno tipo IV y tipo VII. Dicha membrana tiene un espesor de 40 - 60 nm, está formada por una lámina lúcida y una lámina densa, y sus componentes principales son colágeno tipo IV y laminina.

Las células intermedias o alares

Este tipo de células forman de una a tres capas de células poligonales que representan un estado intermedio entre las células superficiales escamosas y las basales, y proceden de la mitosis de estas últimas. Presentan un diámetro de, aproximadamente, 12 a 15 μm y se caracterizan por abundantes tonofilamentos intracelulares de queratina. Las membranas celulares de células intermedias adyacentes están conectadas mediante numerosos desmosomas, uniones adherentes (*Adherens junctions*, AJ) y uniones gap o *gap junctions*.

Las células escamosas, planas o apicales en la superficie

A medida que las células se mueven apicalmente desde las capas de células basales e intermedias, se diferencian finalmente en dos o tres capas de células planas superficiales escamosas, de forma poligonal. Se caracterizan por tener menor tamaño y menor número de orgánulos que las otras células epiteliales. En la cara externa de las células superficiales existen unos procesos, denominados *microvilli*, que sirven para incrementar el área superficial de cada célula, permitiendo así un mejor consumo de oxígeno y adhesión a la película lagrimal. La membrana apical contiene numerosas glicoproteínas y glicolípidos (el denominado glicocáliz) (Gipson *et al.*, 2003; Guzman-

Aranguez *et al.*, 2012a; Argueso, 2013). Debido a las cadenas de oligosacáridos que se encuentran en dicho glicocálix, la membrana tiene propiedades hidrofílicas, lo que permite una interacción más íntima con la capa de mucinas de la película lagrimal, y una mayor estabilidad de la lágrima. Las células escamosas están estrechamente unidas mediante TJ, desmosomas y uniones adherentes.

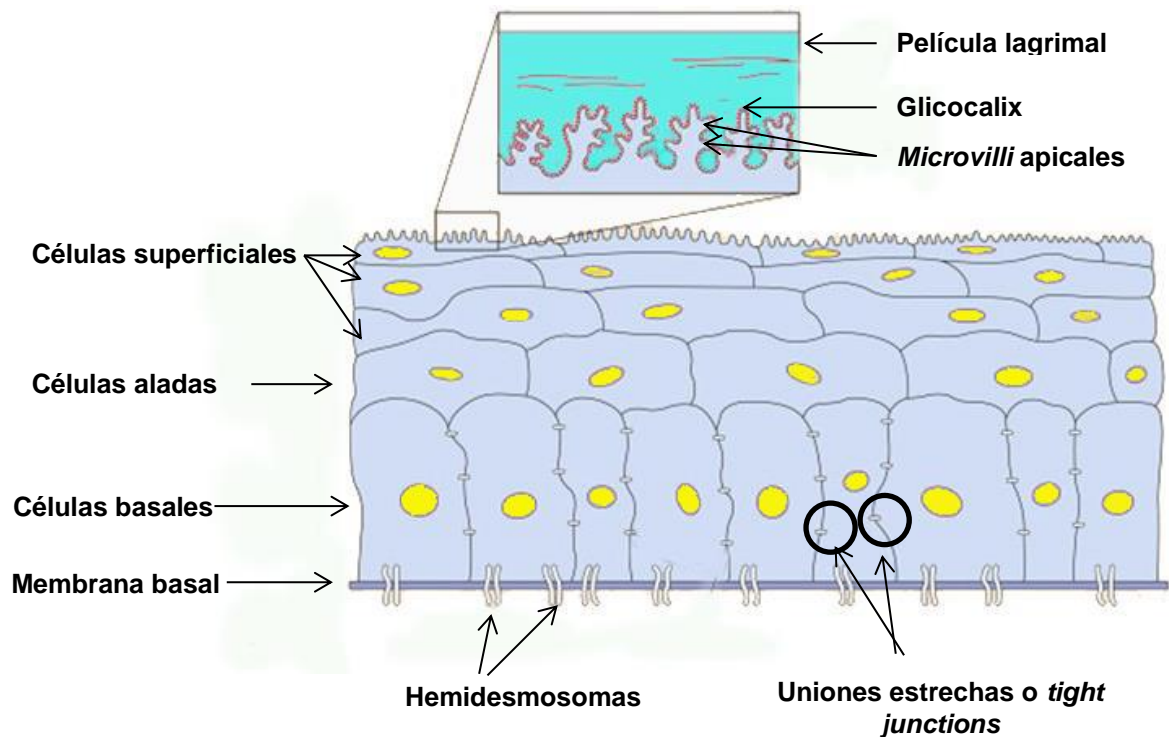


Figura 2. Capas celulares del epitelio corneal. Imagen modificada de Del Monte, 2011.

1.3.1.2. Membrana de Bowman o lámina limitante anterior

Bajo la membrana basal del epitelio corneal se encuentra una estructura de carácter acelular y avascular, denominada membrana de Bowman o lámina limitante anterior, la cual se encuentra exclusivamente en algunas especies animales, como el hombre, los primates y algunas aves (Peris, 2014). En realidad no se trata de una verdadera membrana, sino de una modificación de la parte más anterior del estroma corneal, y presenta un aspecto brillante y liso al observarla macroscópicamente. Su límite anterior está bien definido bajo la membrana basal del epitelio corneal, y el

posterior es más difuso, introduciéndose sus fibras en el estroma y viceversa, existiendo una unión fuerte entre estas dos estructuras. Su espesor medio es de 8-12 μm (Knupp *et al.*, 2009) y está compuesta por proteoglicanos y microfibrillas de colágeno tipos I, III, V, VI, VII y XIII, con disposición irregular (Komai *et al.*, 1991; Marshall *et al.*, 1991a; Marshall *et al.*, 1991b; Krachmer, 2011).

Aunque el papel biológico de esta membrana no está claramente definido, se piensa que puede ser importante en múltiples funciones, como son la estabilidad biomecánica, la protección frente a la radiación solar y la correcta cicatrización corneal, pudiendo ser responsable del mantenimiento de la uniformidad epitelial y como medio de separación entre las células epiteliales y los queratocitos. No se regenera después de sufrir daño y algunos autores la consideran un residuo de las interacciones epitelio-estroma durante el desarrollo embriológico (Wilson *et al.*, 2000).

1.3.1.3. Estroma corneal

El estroma es una parte de la córnea que supone un 90% del grosor corneal total (unas 500 μm), siendo mayor en la periferia, donde alcanza hasta 700 μm (Hassell *et al.*, 2010). La rigidez del estroma corneal anterior parece ser particularmente importante en el mantenimiento de la curvatura corneal (Muller *et al.*, 2001). Está constituido principalmente por agua (78% de hidratación), proteoglicanos (9%) y fibras de colágeno (68%). Las fibras de colágeno que componen el estroma, son principalmente de los tipos I y V (Fini *et al.*, 2005), dando lugar a fibras heterotípicas (Birk, 2001) y, además, se piensa que existen otros colágenos del estroma que pueden ayudar a estabilizar y mantener la estructura corneal (colágeno tipo III, VI, XII, XIII, XV, XVII y XVIII) (Dupps *et al.*, 2006; DelMonte *et al.*, 2011).

Además de colágeno, existen principalmente dos tipos de glucosaminglucanos en el estroma corneal: el queratán sulfato, que está presente en los proteoglicanos queratocano (Chakravarti, 2006), lumicano (Kao *et al.*, 2006) y mimecano (Funderburgh *et al.*, 1997), y el condroitín dermatán sulfato, que forma parte del proteoglicano denominado decorina (Li *et al.*, 1992). El estroma posterior presenta más concentración de queratán sulfato (más hidrofílico), y el anterior contiene mayor concentración de dermatán sulfato (menos hidrofílico) (Muller *et al.*, 2004). Los proteoglicanos se unen a las fibras colágenas de forma ordenada, lo que es esencial para el ordenamiento y el espaciamiento fibrilar, por lo que se asocian con el mantenimiento de la transparencia y la resistencia de toda la estructura corneal, además de contribuir al control de la hidratación corneal debido a su afinidad especial para adherirse al agua.

Por último, los queratocitos, principal tipo de células del estroma, son células grandes, planas y estrelladas, con muchos procesos de filopodios que interconectan con otros queratocitos mediante *gap junctions*. Ante las agresiones, emigran hacia el lugar de conflicto para restaurar las estructuras dañadas. Además, la red de queratocitos proporciona un medio por el cual los nutrientes y metabolitos pasan hacia las regiones centrales de la córnea, y ayudan a excretar los productos de desecho (Poole *et al.*, 2003). Están implicados en el mantenimiento del entorno de la matriz extracelular, sintetizando moléculas de colágeno y glicosaminoglicanos y al mismo tiempo creando metaloproteasas de matriz (MMP) siendo todos estos componentes cruciales en el mantenimiento de la homeostasis del estroma. La mayoría de estos queratocitos residen en el estroma corneal anterior y contienen proteínas cristalinas corneales, las cuales parecen ser responsables en la reducción de la retrodispersión de la luz de los queratocitos y el mantenimiento de la transparencia corneal (Jester *et al.*, 1999).

1.3.1.4. Capa de Dua

Se trata de la sexta capa descubierta en la córnea, sugerida por científicos de la Universidad de Nottingham (Reino Unido) en estudios realizados en 2013, tomando su nombre en honor a su descubridor, el oftalmólogo Harminder Dua (Dua *et al.*, 2013). Es una capa de carácter acelular, situada entre el estroma y la membrana de Descemet y es muy resistente e impermeable al aire, a pesar de su delgadez.

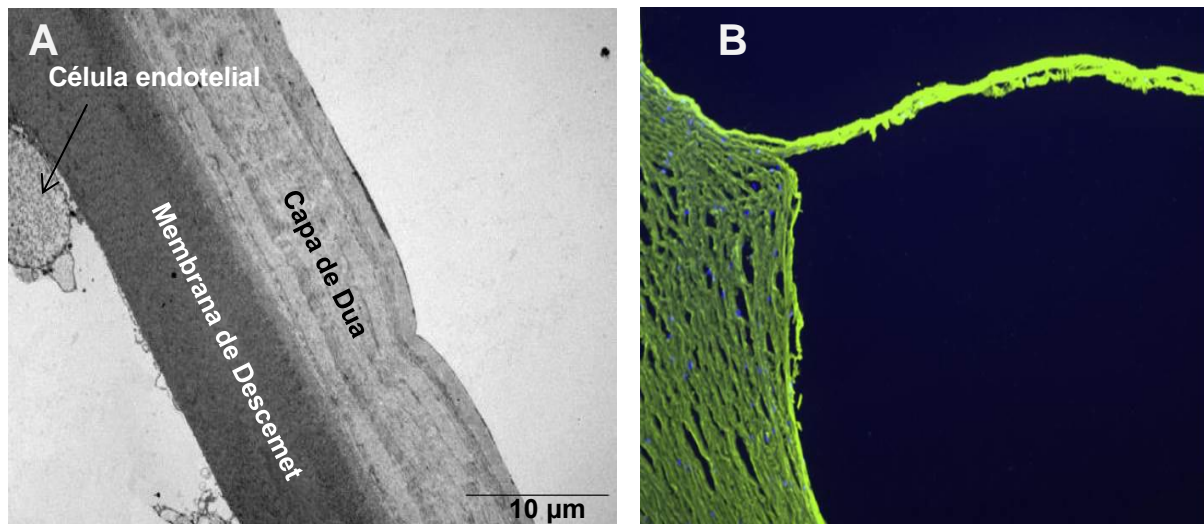


Figura 3. (A) Micrografía electrónica de transmisión: Capa de Dua. (B) Inmunohistoquímica mostrando colágeno tipo I (4 X). Imágenes obtenidas de Dua *et al.*, 2013.

Su descubrimiento surgió tras el análisis de discos esclerocorneales de donantes humanos, inyectando aire en el estroma corneal como en una queratoplastia profunda lamelar anterior con la técnica de burbuja grande (*Big bubble technique*, BB). Se demostró la existencia de una capa pre-Descemet (capa de Dua) en la córnea humana después de obtener tres tipos de burbujas grandes, la primera tras descamación de la membrana de Descemet, seguido de otra burbuja grande y una tercera burbuja que se infló para medir la presión del estallido. Los estudios histológicos confirmaron que la escisión se produjo más allá de la última fila de queratocitos, revelando la capa de pre-Descemet, con un espesor de $10.15 \pm 3.6 \mu\text{m}$ (en un rango desde 6.3 hasta 15.83 μm) (Dua *et al.*, 2013). La capa de Dua está

compuesta por láminas de haces de colágeno (de cinco a ocho, y predominantemente de tipo I) dispuestas en sentido longitudinal, transversal y oblicuo. Se cree que su reconocimiento tendrá un impacto considerable en la cirugía corneal y la comprensión de la biomecánica corneal y la patología corneal posterior como la hidropesía aguda, el descematocele y las distrofias de la capa pre-Descemet.

1.3.1.5. Membrana de Descemet o lámina limitante posterior

Es una membrana muy elástica y fuerte, localizada entre el estroma posterior y el endotelio. Es una capa acelular, compuesta principalmente de colágeno de tipo IV, VIII y glicoproteínas (fibronectina, laminina, trombospondina). Es secretada por las células endoteliales, y se hace más densa con la edad. En el adulto puede alcanzar un grosor de 8 a 10 μm , siendo una de las membranas basales más gruesas en el cuerpo (Krachmer, 2011).

1.3.1.6. Endotelio corneal

Se trata de una monocapa de células cuboideas de 4-6 μm (Knupp *et al.*, 2009) que forman un mosaico hexagonal. El endotelio deriva de la cresta neural y tiene una capacidad proliferativa *in vivo* limitada (Amann *et al.*, 2003). Al no regenerarse las células endoteliales en adultos, se produce una pérdida de población celular con la edad, así como una disminución de su grosor al estar obligadas a cubrir toda la superficie corneal posterior (Hassell *et al.*, 2010; Qazi *et al.*, 2010). Este envejecimiento puede darse de forma exagerada en distrofias y como consecuencia de patología o cirugía ocular. La existencia del endotelio corneal es fundamental para la nutrición del estroma corneal, permitiendo el aporte necesario de nutrientes y regulando el movimiento de agua y sustancias desde el humor acuoso hacia el estroma. Existe un paso constante (pero regulado por las uniones celulares) de humor

acuoso a través de los espacios intercelulares hacia el estroma, junto con el transporte de glucosa, aminoácidos y otros nutrientes esenciales. Debido a este papel del endotelio de regular la hidratación y nutrición corneales, las células endoteliales tienen el núcleo y el citoplasma celular grande, con abundancia de mitocondrias. Además, el endotelio es el encargado de retirar el excesivo fluido acumulado en el estroma, ocasionado por el paso constante de humor acuoso, participando en la excreción hacia el humor acuoso de CO₂ y otros productos finales del metabolismo, y contribuyendo al mantenimiento de la transparencia corneal mediante un mecanismo de bombeo (Riley *et al.*, 1994; Bonanno, 2003; Edelhauser, 2006; Ma *et al.*, 2007).

2. Características anatómicas oculares de algunos modelos animales experimentales y su comparación con la córnea humana

Para el trabajo con modelos animales experimentales en córnea, es crucial que dichos modelos compartan características histológicas similares a las de la córnea humana. En la presente tesis se han elegido el modelo de conejo albino de Nueva Zelanda y el modelo de ratón (utilizándose, dentro de este último, las cepas DBA/2J y C57BL/6J, cuyas características específicas se detallarán más adelante). Se exponen seguidamente algunos apuntes acerca de la anatomía e histología corneal de ambos modelos animales, estableciéndose algunas comparaciones con la córnea humana.

En el humano, la longitud axial del globo ocular es de aproximadamente 24 mm y los diámetros vertical y horizontal son, aproximadamente, de 11 mm y 12 mm (Knupp *et al.*, 2009; Augusteyn *et al.*, 2012). Además, la córnea humana es más delgada en su centro (aproximadamente 500 µm), existiendo una amplia variabilidad entre diferentes individuos y etnias (Doughty *et al.*, 2000; Aghaian *et al.*, 2004; Krachmer, 2011). La cara anterior de la córnea tiene una forma esférica o ligeramente toroidea, con un

radio de curvatura central de aproximadamente 7.8 mm (Courville *et al.*, 2004), y la superficie posterior presenta un radio de aproximadamente 6.5 mm.

La anatomía ocular del conejo es similar a la del humano, por lo que ha sido uno de los modelos más frecuentemente utilizados en la investigación oftalmológica. Las córneas de conejo tienen un gran diámetro con radios de curvatura corneales relativamente menores que los humanos (Bozkir *et al.*, 1997), los cuales varían dependiendo de la edad y el tamaño de los animales (Tabla 1). A nivel histológico, el epitelio corneal, la disposición de laminillas del estroma, y el endotelio de conejo comparten características similares con las córneas humanas (Ojeda *et al.*, 2001). El conejo posee un epitelio corneal más delgado que el del humano, y se compone de una capa de células basales columnares situada debajo de dos capas de células poligonales y hasta seis capas de células aladas y escamosas (Gwon, 2008). Aunque hay algunos grupos de fibrillas, distintas del resto del estroma anterior, las córneas de conejo no tienen una membrana de Bowman bien desarrollada. El estroma tiene un espesor de aproximadamente 0.24 mm, y está formado por fibras de colágeno de 20 a 30 μm , entrelazándose entre sí. Del mismo modo, la membrana de Descemet está presente, mide aproximadamente 7-8 μm (aumentando con la edad) y la disposición de colágeno es diferente a la que existe en las córneas humanas, lo que puede reflejar la diferencia en los requisitos biomecánicos (Ojeda *et al.*, 2001).

Por otra parte, el ratón es un modelo animal muy utilizado en el estudio de enfermedades oculares humanas, incluyendo trastornos hereditarios de la visión, tales como la degeneración retiniana, el glaucoma y la neuropatía óptica (Chang *et al.*, 2002; Weinreb *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2007; McKinnon *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010). La secuenciación de su genoma, la gran variabilidad de cepas transgénicas diferentes y los *knockout* disponibles para diferentes tipos de investigación son las principales razones de su utilización. A pesar de la morfología diferente entre el

humano y el ratón, el genoma de éste comparte 99% de sus genes con los seres humanos (Gunter, 2002).

Existen una serie de diferencias entre la córnea humana y la de ratón. Una desventaja en la utilización del ratón en la investigación de la córnea es que su diámetro corneal es mucho más pequeño que el del humano (Tabla 1). A diferencia del humano, la córnea del ratón es más gruesa en el centro y más delgada en la periferia, teniendo la forma de lente menisco positiva, existiendo cierta discrepancia entre los diferentes estudios sobre el valor numérico exacto del espesor corneal central global y el grosor del estroma central en ratones, debido a las variaciones en las técnicas de medición y a las distintas cepas de ratones utilizados (Zhang *et al.*, 1996; Jester *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2011) (Figura 4). Por otra parte, la córnea de conejo mantiene un espesor uniforme en toda su anchura, siendo similar a una lente plana (Doughty, 1989). La córnea de ratón tiene una forma circular, a diferencia de la humana, la cual es ovalada, y por lo tanto las medidas de los meridianos horizontal y vertical de la córnea de ratón no presentan apenas diferencias (Henriksson *et al.*, 2009) (Tabla 1).



Figura 4. Imagen que muestra la diferencia de espesor entre la córnea central y periférica en un ratón C57BL/6. 40 X. Adaptada de Henriksson *et al.*, 2009.

La curvatura de una córnea de ratón depende de la cepa de ratón, de la edad de los animales, así como de las diferentes técnicas en instrumentación para realizar las medidas (Chou *et al.*, 2011) (Tabla 1). En el humano, el epitelio corneal representa aproximadamente el 10% y el estroma el 90% del espesor total de la córnea (Li *et al.*,

1997), mientras que en el ratón el epitelio contribuye en un 30% y el estroma en un 70% (aproximadamente) al espesor corneal central y periférico total. Comparado con el epitelio humano, el epitelio de ratón consta aproximadamente del doble de capas de células, debido a una elevación comparativa en el número de células escamosas (Bron, 1997; Bergmanson, 2008).

Las fibras de colágeno subepiteliales en el ratón están organizadas aleatoriamente, formando una delgada capa de Bowman, demostrable por microscopía electrónica (Haustein, 1983) aunque algunos autores no la consideran como tal (Rehbinder, 1978; Hazlett, 1993). Con respecto al estroma corneal de ratón, éste se organiza en láminas que se cruzan entre sí en varios ángulos mientras permanece paralelo a la superficie ocular, como es también el caso de la córnea humana (DukeElder, 1961; Bron, 1997). Sin embargo, el entrecruzamiento anterior y las laminillas de ramificación, así como las formaciones electrodensas descritas en los seres humanos no están presentes en los ratones (Bergmanson *et al.*, 2005; Bergmanson, 2008; Mathew *et al.*, 2008). Los queratocitos están presentes principalmente entre las laminillas y tienen una morfología similar a la detectada en humanos y conejos (Clareus *et al.*, 1857; Doughty *et al.*, 2001).

La membrana de Descemet a nivel del estroma tiene una formación hexagonal altamente ordenada de fibras muy finas compuestas de laminina, fibronectina y colágeno de tipo IV, y frecuentemente presenta un aspecto congregado (Rehbinder, 1978; Beuerman *et al.*, 1996). La membrana de Descemet termina en la unión corneoescleral, justo anterior de la malla trabecular, siendo, en muchos casos, una terminación gradual en ratón (Smith, 2002). La estructura corneal del endotelio de ratón se asemeja mucho a la del humano (Bron, 1997; Bergmanson, 2008) y a la de conejo (Prince, 1964; Doughty *et al.*, 1997).

Tabla 1. Estudio comparativo de algunos de los parámetros oculares en humano, conejo y ratón.

ESTRUCTURAS	HUMANO	CONEJO	RATÓN
GLOBO OCULAR			
Longitud axial	24.44 ± 1.03 mm (Augusteyn <i>et al.</i> , 2012)	15.12 ± 0.51 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	3069 ± 43 µm - 3827 ± 43 µm (Chou <i>et al.</i> , 2011)
CÓRNEA			
Diámetro horizontal	11.5 -12 mm (Rufer <i>et al.</i> , 2005; Knupp <i>et al.</i> , 2009)	13.41 ± 0.34 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	Sin diferencias entre el diámetro horizontal y el vertical (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Diámetro vertical	11 mm (Rufer <i>et al.</i> , 2005; Knupp <i>et al.</i> , 2009)	13.02 ± 0.30 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	Sin diferencias entre el diámetro horizontal y el vertical (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Radio de curvatura anterior	7.8 mm (Courville <i>et al.</i> , 2004)	7.26 ± 0.26 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	1301 ± 76 µm - 1474 ± 40 (Chou <i>et al.</i> , 2011)
Espesor epitelial	50 - 60 µm (Knupp <i>et al.</i> , 2009)	26.1 µm - 42.8 µm (Goes <i>et al.</i> , 2008)	Espesor epitelial central: (37.12 ± 2.3 µm - 51 µm) Espesor epitelial periférico: (17.86 ± 6.6 µm - 22.39 ± 2.5 µm) (Zhang <i>et al.</i> , 1996; Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Espesor corneal central	535 ± 20 µm (Doughty <i>et al.</i> , 2000)	(341 ± 14 µm - 404 ± 12 µm) (Riau <i>et al.</i> , 2012)	106.00 µm ± 3.45 µm - 170 µm (Zhang <i>et al.</i> , 1996; Schulz <i>et al.</i> , 2003; Henriksson <i>et al.</i> , 2009; Lively <i>et al.</i> , 2010)
Espesor corneal periférico	657 ± 71 µm (Doughty <i>et al.</i> , 2000)	450 µm (Davis, 1929)	68.00 ± 6.8 µm - 90.55 ± 1.9 µm (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Endotelio corneal	4 - 6 µm (Knupp <i>et al.</i> , 2009)	2.6 µm (Doughty <i>et al.</i> , 1997)	2.15 µm (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)

3. Funciones principales de la córnea

La córnea es un tejido altamente diferenciado, con una elevada regularidad y uniformidad, lo que permite la refracción y la transmisión de la luz, dos de sus principales funciones junto a la de protección de las estructuras oculares internas,

ejerciendo como barrera entre el ojo y el medio ambiente (Bennett, 2004; Krachmer, 2011).

En concreto, supone una barrera metabólica, regulando el paso de líquidos y de ciertas sustancias, y también actúa como barrera frente a agentes externos. Asimismo, muestra una gran resistencia a la abrasión del parpadeo o de las lentes de contacto gracias a su denso entramado intercelular, así como una capacidad de cicatrización rápida.

3.1. Refracción corneal

Constituye el principal elemento refractivo del ojo, tratándose de una lente cóncavo convexa que contribuye aproximadamente a 43 de las 60 dioptrías (D) del sistema óptico ocular, representando aproximadamente el 70% de la refracción total, debiendo mantener sus superficies refractivas curvas regulares y lisas, así como una perfecta transparencia (Courville *et al.*, 2004). La superficie anterior de la córnea se caracteriza por su asfericidad, tendiendo a disminuir su curvatura hacia la periferia para corregir la aberración de esfericidad, y la córnea central es la que más interviene en la imagen foveal, siendo la dilatación pupilar el factor determinante del grado de participación de la córnea periférica.

3.2. Transparencia corneal, transmisión de la luz

La córnea es una “ventana” de tejido conectivo transparente situada en la parte frontal del ojo, y dicha transparencia se debe a tres hechos: 1) todas las fibras de colágeno corneales tienen un diámetro uniforme constante; 2) están regularmente espaciadas unas de otras y se disponen paralelamente a la superficie de la córnea; 3) la córnea está relativamente deshidratada en comparación con otros tejidos conectivos, como la esclerótica. El epitelio es el lugar de mayor absorción de luz por la córnea, principalmente para las longitudes de onda cortas (McMenamin PG, 1997).

Debido al mínimo espesor corneal, al diámetro constante y a la disposición de las fibras de colágeno del estroma, la luz se transmite adecuadamente sin sufrir pérdidas significativas a su paso por la córnea, estando comprendida la capacidad de transmisión de luz por la misma entre los 310 nm (radiación ultravioleta) y los 2.500 nm (radiación infrarroja).

3.3. Función de respuesta ante agresiones

La córnea está expuesta a agresiones naturales (traumatismos) o iatrogénicas (cirugía, láseres, lentes de contacto), que pueden desencadenar una respuesta de cicatrización por parte de la córnea, siendo éste un proceso complejo, debido a la organización estricta de su estructura. La renovación epitelial se produce cada 7 días (Thoft *et al.*, 1983) pero ante una erosión o un defecto se inicia una reacción que consiste en tres fases diferentes: 1) la fase latente, periodo de 4 a 6 horas donde se eliminan los restos celulares, las células se redondean y se reducen los hemidesmosomas del área de la lesión (Dua *et al.*, 1994); 2) la fase de migración celular, que dura entre 24 y 36 horas, donde se acelera la movilidad celular y se llega a cubrir en poco tiempo la pérdida de tejido, recuperándose el efecto de barrera gracias a un incremento de la superficie celular y a la formación de fibrillas y filamentos, y donde la fibronectina parece tener un papel fundamental, permitiendo una fuerte unión celular con la membrana basal (Gipson *et al.*, 1993); 3) la fase de proliferación celular, donde se activan las células primordiales del limbo, desarrollándose los complejos de unión con la membrana basal y restableciéndose las terminaciones nerviosas. Tras producirse una lesión en el estroma se liberan citoquinas que provocan el movimiento de los queratocitos hacia los márgenes de la herida, formándose de nuevo tejido colágeno y mucopolisacáridos. En este proceso las células pierden su especialización y liberan sustancias que son comunes a otras heridas producidas (Durán de la Colina).

3.4. Función de barrera de la córnea: transporte a través de las rutas transcelular y paracelular

La córnea es una barrera química y mecánica que impide el paso de cualquier compuesto extraño (incluyendo fármacos) en el ojo, siendo necesarios más estudios para conseguir una mayor comprensión de los factores que limitan la penetración de dichos agentes extraños a través de su estructura (Mun *et al.*, 2014). En muchos casos, la disfunción de esta barrera conduce a enfermedades clínicas, tales como ojo seco, queratitis infecciosa, queratoconjuntivitis alérgica, lesión química, y defectos epiteliales persistentes. El epitelio corneal es la principal barrera que restringe la absorción de fármacos en el ojo (Jarvinen, 1995; Swarbick, 2001), mientras que el estroma y el endotelio ofrecen menor resistencia a la permeabilidad transcorneal de moléculas polares y cargadas, que, sin embargo, inhiben la penetración de compuestos altamente lipofílicos al ser capas esencialmente acuosas (Huang *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1989).

La función de barrera de la superficie ocular se define como la permeabilidad de la córnea y el epitelio conjuntival al agua y grandes solutos, incluyendo iones, y está determinada por componentes epiteliales y subepiteliales. La pérdida de dicha barrera puede desencadenar el posible paso de entidades de mayor tamaño, como agentes patógenos. En los epitelios, el transporte de iones, solutos y agua se realiza por medio de las rutas transcelular y paracelular (Kapus *et al.*, 2006) (Figura 5).

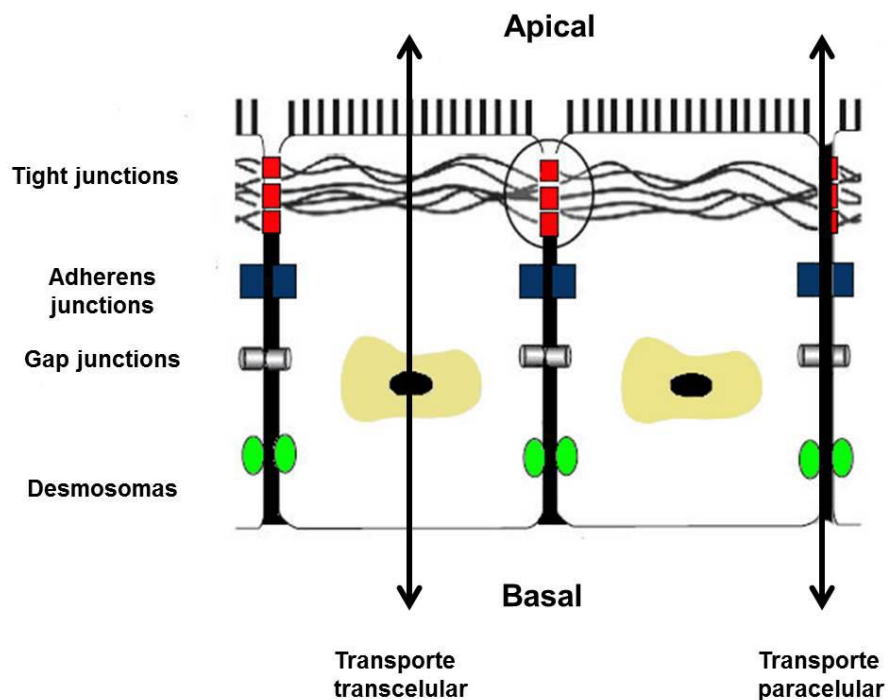


Figura 5. Representación esquemática de la función de barrera de la córnea. Transporte a través de las rutas transcelular y paracelular. Imagen adaptada de Johnson, 2005.

La permeabilidad transcelular es el movimiento de iones o moléculas a través de transportadores apicales y basolaterales o de canales a través de la membrana, siendo muy limitada la literatura sobre dicho transporte en la superficie ocular. En el epitelio corneal, diversos estudios han sugerido además la contribución de las mucinas transmembrana y su glicocálix en la formación de una barrera que limita el transporte transcelular (Argueso *et al.*, 2009; Guzman-Aranguez *et al.*, 2012a).

La permeabilidad paracelular, por otro lado, es la difusión de los iones o moléculas a través del espacio intercelular, impulsado por el gradiente electroquímico transepitelial (Hu *et al.*, 2013). Se compone de complejos constituidos por uniones estrechas, formadas predominantemente por proteínas como la ocludina, las claudinas y las *zonula ocludens* (Fischbarg *et al.*, 2006).

4. Sistemas de unión celulares

4.1. Estructura y función de las uniones intercelulares

Las interacciones célula-célula son de crucial importancia, ya que actúan a modo de barreras que modulan el paso selectivo de moléculas, iones, agua e incluso células, contribuyendo a mantener la homeostasis en el cuerpo (Cummins, 2012). En los tejidos epiteliales estas uniones intercelulares se caracterizan por presentar un complejo apical que contiene TJ, AJ, y desmosomas, donde cada una de ellas posee características morfológicas y funcionales únicas (Dejana *et al.*, 2008). Las TJ están formadas por microdominios de la membrana plasmática, compuestos de múltiples puntos fusionados (*kissing points*) entre las caras exteriores de las membranas plasmáticas de células adyacentes, de tal manera que rodean el polo apical de cada célula en forma de una franja continua (Ban *et al.*, 2003).

Las uniones estrechas tienen dos funciones, principalmente. Por un lado actúan impidiendo la mezcla de proteínas de membrana entre la membrana apical y la basolateral (*fence function*). Por otro lado, Diamond acuñó la expresión de *gate function* refiriéndose a la capacidad de las TJ para regular específicamente el transporte paracelular entre las células, haciendo referencia a la capacidad de las TJ para restringir los procesos de difusión paracelular y para permitir selectivamente el transporte paracelular de ciertos iones (Diamond, 1977). Hasta la actualidad se han identificado una gran cantidad de proteínas que componen las TJ, englobándose dentro de tres grupos: proteínas integrales de membrana, proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia y proteínas de señalización.

1) Proteínas integrales de membrana

Las proteínas integrales de membrana o transmembrana son los únicos componentes de las TJ que tienen porciones intra y extracelulares. Dentro de este grupo, existen proteínas transmembrana de dominio único incluyendo las moléculas adhesivas de conexión (*Junctional adhesion molecule* o *JAM*, Crb3 y CAR), proteínas transmembrana de dominio triple, y por último, las proteínas transmembrana con cuatro dominios, como son la familia de las claudinas y las proteínas *marvel* asociadas a TJ (*TJ-associated marvel proteins* o *TAMPs*) que incluyen ocludina, tricelulina, y MarvelD3.

Ocludina fue la primera molécula de las TJ identificada como proteína integral de membrana (Furuse *et al.*, 1993). Con un peso aproximado de 65 kDa, presenta cuatro dominios transmembranales, un dominio carboxilo-terminal largo y uno amino-terminal corto, ambos citoplasmáticos, así como dos asas extracelulares similares en tamaño y ricas en residuos de tirosina (Balda *et al.*, 2008) (Figura 6). El dominio de la región carboxilo-terminal de ocludina interactúa con otras proteínas constituyentes de las TJ, como ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (*zonula ocludens* 1, 2 y 3), siendo importante para la regulación de las mismas (Feldman *et al.*, 2005; Cummins, 2012). En el epitelio y endotelio corneales se ha identificado RNAm de ocludina en cultivos primarios de células epiteliales y endoteliales corneales humanas (Chen *et al.*, 2007). Asimismo, se ha comprobado mediante inmunohistoquímica la expresión de ocludina en las áreas de contacto célula-célula, tanto en humano (Ban *et al.*, 2003) como en conejo (Chen *et al.*, 2012) y en ratón (Sosnova-Netukova *et al.*, 2007).

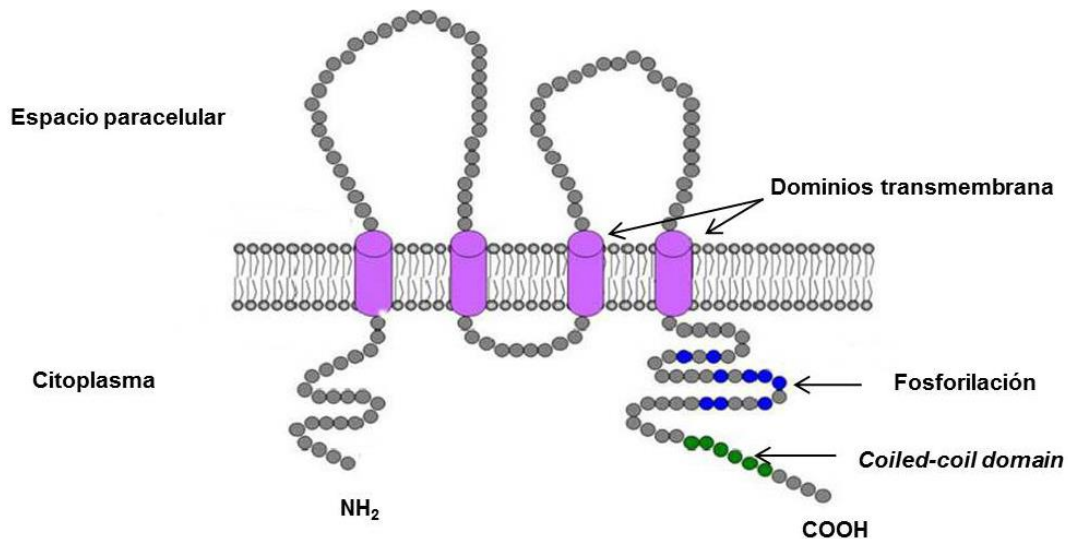


Figura 6. Representación esquemática de ocludina. Posee un extremo carboxilo terminal rico en residuos de serina, treonina y tirosina para la fosforilación, así como dominios (*coiled-coil domain*) que interactúan con otras proteínas constituyentes de las TJ. Imagen obtenida de Hu *et al.*, 2013.

Claudinas

Hasta la actualidad se han identificado 27 componentes de la familia de las claudinas en mamíferos, con pesos moleculares comprendidos entre 20 y 34 kDa (Lal-Nag *et al.*, 2009), tres de los cuales se han incluido recientemente (Wu *et al.*, 2006; Mineta *et al.*, 2011) aunque existe desacuerdo en cuanto a que todos deban ser clasificados como claudinas (Maher *et al.*, 2011). Las claudinas contienen cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y regiones citoplásmicas amino y carboxi-terminales (Figura 7). Dichas regiones carboxi-terminales, tienen dominios PDZ (cuyo nombre procede de las tres proteínas donde se identificaron en primer lugar: PSD-95, *Discs large* y ZO-1) que interactúan con las proteínas citoplásmicas de andamiaje ZO-1, -2, -3, la proteína MUPP-1 (*multi-PDZ domain protein 1*) y PATJ (*PALS1-associated TJ protein*) (Hamazaki *et al.*, 2002; Storrs *et al.*, 2007; Findley *et al.*, 2009; Lal-Nag *et al.*, 2009). La distribución de las isoformas de las claudinas depende en gran parte de las características del tejido u órgano del que se trate.

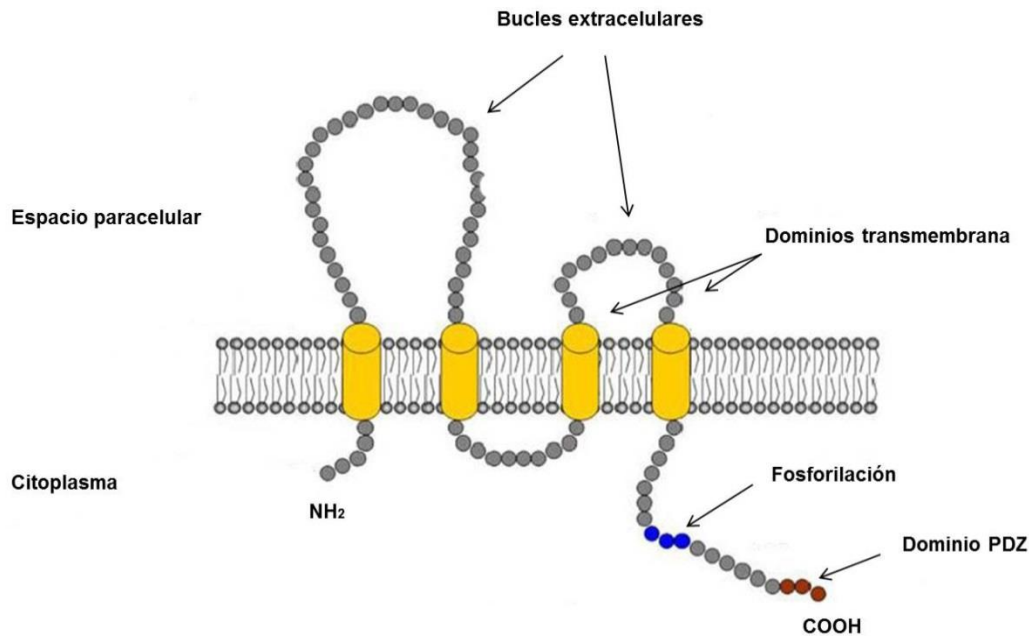


Figura 7. Representación esquemática de claudina. Posee un extremo carboxilo terminal, el cual puede ser fosforilado, así como dominios PDZ que pueden unirse a otras proteínas constituyentes de las TJ (como ZO-1, -2, -3, MUPP-1 y PATJ). Imagen obtenida de Hu *et al.*, 2013.

En el epitelio corneal humano se han identificado mediante RT-PCR las claudinas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 22, 23, y 24, comprobándose mediante inmunohistoquímica la expresión de las claudinas 1, 3, 4, 7, 11, 14 y 23 (Yi *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado mediante inmunohistoquímica la expresión de claudina-1 en el epitelio corneal de conejo y de ratón (Sosnova-Netukova *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). En el caso del endotelio corneal humano, se han identificado también mediante inmunohistoquímica y RT-PCR las claudinas 1, 2, 4, 7, 10, 11, 15, 22 y 23, observándose, además, los transcritos de las claudinas 3, 10b y 24. En el caso del estroma, se han descrito mediante RT-PCR las claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10b, 11, 12, 14, 15, 22, 23 y 24 (Inagaki *et al.*, 2013), identificándose, además, la claudina 14 mediante inmunodetección.

2) Proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia de la membrana

La familia de proteínas denominada *zonula ocludens* (ZO) está compuesta por tres variantes, ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que son proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia de la membrana, pudiendo ser también componentes de las AJ (Fanning *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2010). ZO-1 fue el primer componente de las TJ en ser identificado y cuenta con una masa molecular de 220 kDa (Stevenson *et al.*, 1986). Existen dos variantes de la proteína ZO-1, resultado del corte alternativo de intrones (*splicing*), que se diferencian por la presencia o ausencia de un dominio de 80 aminoácidos denominado dominio α . La isoforma que contiene dicho dominio α^+ está presente en las células epiteliales, mientras que la isoforma α^- se limita a las células endoteliales y células de Sertoli (Balda *et al.*, 1993).

Cuando se inmunoprecipitó ZO-1, con ella coprecipitaron otras dos proteínas con masas moleculares de 160 y 130 kDa, que también mostraron localización específica en las TJ, por lo que estas proteínas fueron designadas como ZO-2 y ZO-3 (Jesaitis *et al.*, 1994; Haskins *et al.*, 1998).

ZO-1 es un componente universal de las TJ e interactúa con múltiples proteínas que forman parte de las uniones estrechas, desempeñando un papel relevante en el mantenimiento de la función de barrera (Hartsock *et al.*, 2008). Mediante inmunodetección se ha demostrado la expresión de ZO-1 en el epitelio corneal humano, formando anillos continuos alrededor de las células epiteliales (Ban *et al.*, 2003; Yanai *et al.*, 2009), así como en el epitelio corneal de conejo (junto a ZO-2) (Chen *et al.*, 2012) y de ratón (Sosnova-Netukova *et al.*, 2007). Asimismo, se ha detectado la expresión de dicha proteína en el endotelio corneal humano (Mandell *et al.*, 2007; He *et al.*, 2011), de conejo (Mandell *et al.*, 2006) y de ratón (Sosnova-Netukova *et al.*, 2007) (Figura 8).

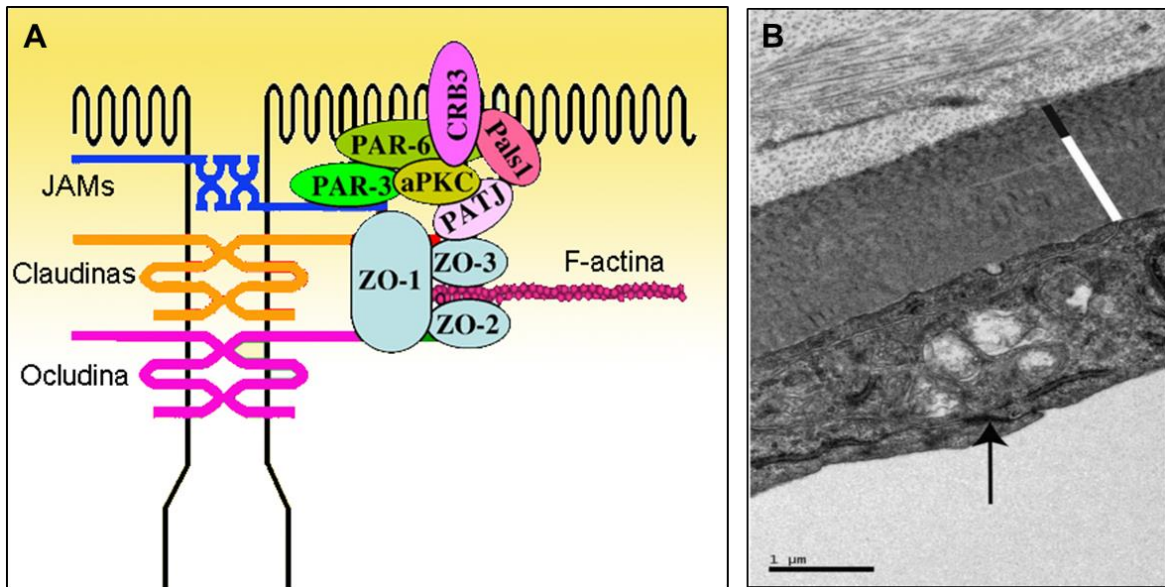


Figura 8. (A) Representación esquemática de las TJ. Imagen adaptada de Hideki Chiba (2007). **(B) Células endoteliales de ratón unidas mediante zonula occludens (flecha negra).** Imagen obtenida de Henriksson *et al*, 2009.

3) Proteínas de señalización

El tercer componente del grupo de proteínas que conforman las TJ son las proteínas de señalización, que pueden estar relacionadas en el ensamblaje de las uniones, además funcionan como moléculas de señalización intracelular y como factores de transcripción de diferentes genes como es el caso de β -catenina y ZONAB (factor de transcripción asociado a ZO-1) (Itoh *et al.*, 2003).

4.2. Factores moduladores de las TJ

4.2.1. Vías de señalización intracelulares

Las uniones intercelulares no son estáticas, sino que están constantemente reguladas por estímulos intracelulares y extracelulares, los cuales modifican la expresión de los componentes de las TJ, o su interacción con el citoesqueleto intracelular, regulando así la permeabilidad paracelular. Entre las vías de señalización

intracelular que regulan la formación, el mantenimiento y el ensamblaje de las TJ se encuentran las proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCK), las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC), y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), las cuales modifican el estado de fosforilación o la expresión de las TJ (Matter *et al.*, 2003; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008a; Hu *et al.*, 2013). Junto con dichas rutas de señalización intracelular, existen otros agentes y moléculas como son las metaloproteinasas de matriz, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas que también median la regulación de las TJ, y, por lo tanto, la permeabilidad paracelular.

Proteínas Rho quinasas (ROCK)

Las proteínas serina/treonina quinasas (Rho quinasas, ROCK) fueron los primeros efectores identificados y mejor caracterizados de proteínas Rho, cuyas dos isoformas, ROCK 1 y 2, se expresan en células epiteliales corneales humanas (Yin *et al.*, 2008) entre otros tejidos (Leung *et al.*, 1995; Ishizaki *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996). Algunos estudios sugieren que ROCK se requiere para el montaje y mantenimiento de las TJ, probablemente a través de sus efectos en la organización del citoesqueleto de actina durante la formación de las uniones. Se ha descrito que la inhibición de ROCK (mediante el inhibidor Y-27632) deteriora la formación y mantenimiento de la barrera generada por las uniones estrechas, detectándose una disminución de la resistencia transepitelial así como interrupciones en el marcaje de ocludina (Yin *et al.*, 2008). Del mismo modo, en la morfología de cultivos *ex vivo* e *in vitro* de células endoteliales humanas (*Human corneal endothelial cells*, HCEC), el compuesto Y-27632 produjo cambios morfológicos con pérdida de la forma poligonal y bordes celulares irregulares en el patrón de expresión de ZO-1, en comparación con células control (Pipparelli *et al.*, 2013).

Proteínas quinasas A y C

El adenosín monofosfato cíclico (AMPc) funciona activando la proteína quinasa A o PKA, cuya estimulación produce una mejora en la integridad de la barrera, disminuyendo la permeabilidad paracelular en el endotelio corneal (Srinivas *et al.*, 2004). Los efectos de la PKC en la regulación de la permeabilidad paracelular son diferentes, algunos incluso contradictorios, lo que parece ser debido a sus distintas isoformas, con diferentes estructuras, sustratos y distribución celular (Zeng *et al.*, 2012). Se ha visto que en células endoteliales retinianas humanas microvasculares, la activación de PKC- δ y su translocación subcelular desde el citosol a la membrana está fuertemente asociada con el aumento de la permeabilidad vascular en la retinopatía diabética, al disminuir los niveles proteicos de las proteínas ZO-1 y ZO-2 (Kim *et al.*, 2010). En la córnea, la activación de la proteína quinasa C (PKC) por la exposición de las células epiteliales corneales humanas cultivadas con el activador forbol 12-miristato 13-acetato (*phorbol 12-myristate 13-acetate* o *PMA*) produce un incremento en la permeabilidad paracelular y disrupción de TJ mediante la activación de MAPK (Wang *et al.*, 2004).

Vía de señalización MAP quinasa

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son serina/treonina proteínas quinasas que responden a estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento y estrés, y regulan diversas actividades celulares incluyendo la expresión génica, la mitosis, la diferenciación celular y la apoptosis. En los mamíferos están presentes cuatro grupos distintos de MAPKs: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las c-Jun quinasas N-terminal (JNKs), las isoformas de p38, y por último un cuarto grupo llamado ERK5.

La ruta de señalización de las MAPK es capaz de modular, a nivel ocular, el transporte paracelular a través de las TJ, produciendo su ensamblaje o disrupción en función del estímulo, así como de la MAPK involucrada y del tipo celular (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de efectos inducidos por las MAPK sobre las TJ en distintas localizaciones oculares.

ESTÍMULO	MAPK INVOLUCRADA	EFFECTO SOBRE LAS TJ	TIPO CELULAR/ MODELO ANIMAL	REFERENCIAS
cAMP	p38 (inhibición)	Impide la disrupción de ZO-1 en las zonas de contacto célula-célula inducida por TNF- α	Células endoteliales corneales bovinas (BCECs)	(Shivanna <i>et al.</i> , 2010)
Dobesilato de calcio	p38 (inhibición)	Previene la disminución de los niveles proteicos de claudina-5 y ocludina, así como la alteración en la localización de ZO-1 y ocludina	Vasos de retina de rata	(Leal <i>et al.</i> , 2010)
Endostatina	ERK1/2; p38 (activación)	Aumenta los niveles proteicos de ocludina	Células endoteliales microvasculares de la retina (RMECs)	(Campbell <i>et al.</i> , 2006)
HIV-1 Transactivator Tat protein	ERK1/2 (activación)	Disminuye la expresión, niveles proteicos y RNAm de las claudinas-1, 3 y 4 y aumenta los de claudina-2	Línea celular de epitelio pigmentario de la retina humano (RPE D407)	(Bai <i>et al.</i> , 2008)
Inductores de estrés	p38 (activación)	Disminuye los niveles proteicos y RNAm de claudina-5	Células endoteliales retinianas humanas (HRECs)	(Adachi <i>et al.</i> , 2012)
Péptido PHSRN de la fibronectina	ERK 1 /2; p38; JNK (activación)	Aumenta los niveles proteicos y RNAm de ZO-1	Células epiteliales corneales humanas (HCLE)	(Yanai <i>et al.</i> , 2009)
PLGF-1	ERK1/2 (activación)	Induce la desaparición de ZO-1 de los bordes celulares	Línea celular de epitelio pigmentario de la retina humano (ARPE-19)	(Miyamoto <i>et al.</i> , 2007)
PMA	ERK1/2 (activación)	Altera la distribución de ZO-1 y ocludina	Línea celular epitelial corneal humana inmortalizada (THCE)	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
Pulso electromagnético	p38 (activación)	Disminuye los niveles proteicos de ocludina y claudina-5	Células endoteliales coroideas (RF/6A)	(Li <i>et al.</i> , 2013)
TNF-α	p38 (activación)	Altera la distribución celular y disminuye los niveles proteicos de ZO-1	Cultivos primarios de endotelio corneal bovino y células porcinas polarizadas del epitelio pigmentario de la retina	(Shirasawa <i>et al.</i> , 2013; Rajashekar <i>et al.</i> , 2014)

Así, en la córnea se ha comprobado que la activación de la PKC en células epiteliales corneales con PMA provoca una disminución de la TEER a través de la activación de ERK 1/2 MAPK (Wang *et al.*, 2004). Otros estudios realizados en células epiteliales corneales humanas (HCE) demuestran que, la secuencia del péptido PHSRN de la fibronectina, produce un aumento de los niveles de mRNA y de los niveles proteicos de ZO-1 a través de la activación de las MAPK (ERK 1/2, p38, JNK) (Yanai *et al.*, 2009).

4.2.2. Otros agentes que modulan las TJ

Entre los diferentes agentes que pueden modular la estructura y función de las TJ están los factores de crecimiento (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008b). Así, por ejemplo, el tratamiento de células Caco-2 con el factor de crecimiento epidérmico EGF evita que se produzca la interrupción inducida por peróxido de hidrógeno en la organización de ocludina y ZO-1 (Basuroy *et al.*, 2006). Por otra parte, otros estudios muestran que el tratamiento con el factor de crecimiento de hepatocitos HGF (*Hepatocyte growth factor* o *HGF*) en células del epitelio pigmentario de la retina de vaca, produce una marcada disminución de los niveles de proteínas constituyentes de las TJ, como ZO-1 y ocludina, así como una disminución significativa en el marcaje de ZO-1, ocludina y claudina-1 a las 6 horas después de dicho tratamiento (Jin *et al.*, 2002). Asimismo, la exposición de una línea de células humanas del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19) a condiciones de hipoxia o a insulina induce un incremento en la expresión del factor de crecimiento placentario PLGF-1 (*Placental Growth Factor-1* o *PIGF-1*) que, a través de la activación de MEK, origina la desaparición de ZO-1 de los bordes celulares provocando un aumento de la permeabilidad transcelular (Miyamoto *et al.*, 2007).

El calcio, tanto extracelular como intracelular, es otro importante factor implicado en el mantenimiento de la matriz intercelular de las proteínas constituyentes de las TJ de muchos tipos celulares. Respecto al calcio extracelular, se ha demostrado que en monocapas de células epiteliales mamarias de ratón cultivadas en medio libre de calcio, se obtuvieron valores reducidos de TEER, con la disrupción de ZO-1, ZO-2 y ocludina y el resultante aumento de la permeabilidad paracelular (Klingler *et al.*, 2000). De forma análoga, el ensamblaje y el desensamblaje de TJ y AJ en células BCEC se produce por una adición y una reducción del Ca^{2+} extracelular, respectivamente (Ramachandran *et al.*, 2010).

El calcio intracelular supone también otro factor significativo en la regulación de la integridad de las TJ, siendo crítica su regulación para un funcionamiento normal de dichas proteínas. La reducción de calcio intracelular produce cambios en las uniones de la proteína ZO-1 con la actina, y altera la localización subcelular de ocludina (Ye *et al.*, 1999) en células renales caninas (*Madin Darby Canine Kidney Cells*, o MDCK). Del mismo modo, la depleción de los depósitos de calcio del retículo endoplásmico altera la biogénesis de desmosomas y TJ en células MDCK (Stuart *et al.*, 1996).

Además, existen otras moléculas y agentes que intervienen en la modulación de las TJ, como las metaloproteinasas de la matriz o las citoquinas (Matter *et al.*, 2003; Matter *et al.*, 2005; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008a; Capaldo *et al.*, 2009; Blasig *et al.*, 2011).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) también intervienen en la regulación de proteínas que forman parte de las TJ en la superficie ocular, procesos que pueden ser dependientes de galectina o estar regulados por el inductor extracelular de MMP CD147 (también conocido como EMMPRIN) (Huet *et al.*, 2011; Mauris *et al.*, 2014). Así, EMMPRIN induce la expresión de MMP-9, produciendo una

disminución en los niveles proteicos y en la expresión de ocludina en la membrana de las células epiteliales de la córnea humana (Huet *et al.*, 2011).

Las citoquinas pro-inflamatorias (como $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, IL-13, IL-17, IL-6) son otras moléculas que alteran el ensamblaje y funcionamiento de las TJ. Estas moléculas inducen cambios significativos en la expresión de TJ, tanto a nivel de RNAm como de proteína, así como cambios en su patrón de localización, desencadenando la alteración de la integridad de la barrera (Contreras-Ruiz *et al.*, 2012). De modo similar, la citoquina proinflamatoria IL-1 β es capaz de alterar la localización subcelular de las proteínas ZO-1 y ocludina en células de epitelio corneal humano (Kimura *et al.*, 2009), produciendo la disrupción de la función de barrera.

Por otra parte, se ha comprobado que otros factores como por ejemplo la hipoxia, pueden inducir alteración de la función de barrera en células epiteliales corneales humanas (HCE). Tal y como demostraron los estudios de inmunofluorescencia realizados en dichas células, la hipoxia indujo la pérdida de la localización de la proteína ZO-1 (en los bordes de las células epiteliales adyacentes), así como una disminución de los niveles proteicos (Kimura *et al.*, 2010). Por otro lado, Yin *et al* demostraron un aumento de la expresión de ocludina y de la función de la barrera epitelial tras la estimulación de células de epitelio corneal privadas de suero con metabolitos de la vitamina D 25 (OH) D3 y su metabolito activo 1.25 (OH) 2D3 (Yin *et al.*, 2011). También se ha demostrado que la sustancia P incrementa la expresión de ZO-1 a través de la activación de las ERK, promoviendo la función de barrera en células corneales epiteliales humanas (Ko *et al.*, 2009).

5. El sistema purinérgico

Los nucleótidos (monodinucleótidos y dinucleótidos) son mensajeros extracelulares con una amplia participación en procesos bioquímicos y biológicos relevantes en diferentes tejidos, y, en particular, en el ojo, donde, además, pueden presentar distintas aplicaciones terapéuticas. En la década de 1970, se propuso el papel de los nucleótidos y nucleósidos como mensajeros extracelulares (Burnstock, 1972) y a lo largo de este tiempo su interés científico ha ido creciendo progresivamente hasta la actualidad (Miras-Portugal *et al.*, 1999; Burnstock, 2007b; Jacobson *et al.*, 2010; Burnstock, 2012; Miras-Portugal *et al.*, 2015).

5.1. Receptores P2: P2X y P2Y

Los nucleótidos extracelulares actúan estimulando receptores purinérgicos de membrana de tipo P2 en la superficie celular, los cuales transmiten mensajes a la célula y producen cambios bioquímicos que desencadenan diferentes procesos fisiológicos. Este grupo de receptores P2 se divide en dos familias, los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y (von Kugelgen *et al.*, 2011).

Los receptores P2X son canales iónicos activados por nucleótidos que median el paso rápido (milisegundos) y no selectivo de cationes (principalmente Na⁺, K⁺ y Ca²⁺) (Bo *et al.*, 2003) desde el espacio extracelular, produciendo una despolarización de la membrana y la posterior activación de canales de calcio dependientes de voltaje. Se han identificado siete miembros de receptores purinérgicos de tipo P2X en mamíferos (la forma de nombrarlos ha sido actualizada por el Comité de Nomenclatura de la IUPHAR, cambiando su nomenclatura de P2X₁₋₇ a P2X1-7 (Collingridge *et al.*, 2009)) y varias formas de combinados de estas subunidades. La clonación de los receptores P2X ha puesto de manifiesto que todas las subunidades tienen un bucle

extracelular grande con diez residuos de cisteína, dos dominios transmembrana y extremos C y N terminales cortos intracelulares de longitudes variables (Silberberg *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2006). Son necesarias tres subunidades para la formación de un canal funcional nativo, y estos canales están organizados como homotrímeros o heterotrímeros (Coddou *et al.*, 2011) (Figura 9 A).

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos, miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Contienen siete dominios transmembrana hidrófobos conectados por tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares (Jacobson *et al.*, 2010), con un extremo N-terminal extracelular y otro C terminal orientado intracelularmente (Figura 9 B). Dichos receptores se acoplan a proteínas de membrana, como PLC, adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G, y activan diversos mecanismos de señalización intracelular (Ralevic *et al.*, 1998; Abbracchio *et al.*, 2003). Hasta la actualidad, la familia P2Y se compone de ocho miembros (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄) codificados por genes distintos, y han sido clonados y caracterizados en tejidos humanos y de mamíferos (Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock, 2007a). Pueden subdividirse en dos grupos basados en su acoplamiento a proteínas G específicas. En un grupo se englobarían los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁, los cuales se acoplan a proteínas Gq para activar la fosfolipasa C β , permitiendo la formación de inositol trifosfato (IP₃) y la movilización de Ca²⁺ intracelular, y en el otro grupo se incluirían los receptores asociados con proteínas Gi para inhibir la adenilato ciclasa (P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄). P2Y₁₁ es el único que puede acoplarse a través de proteínas Gq y Gs (Jacobson *et al.*, 2012).

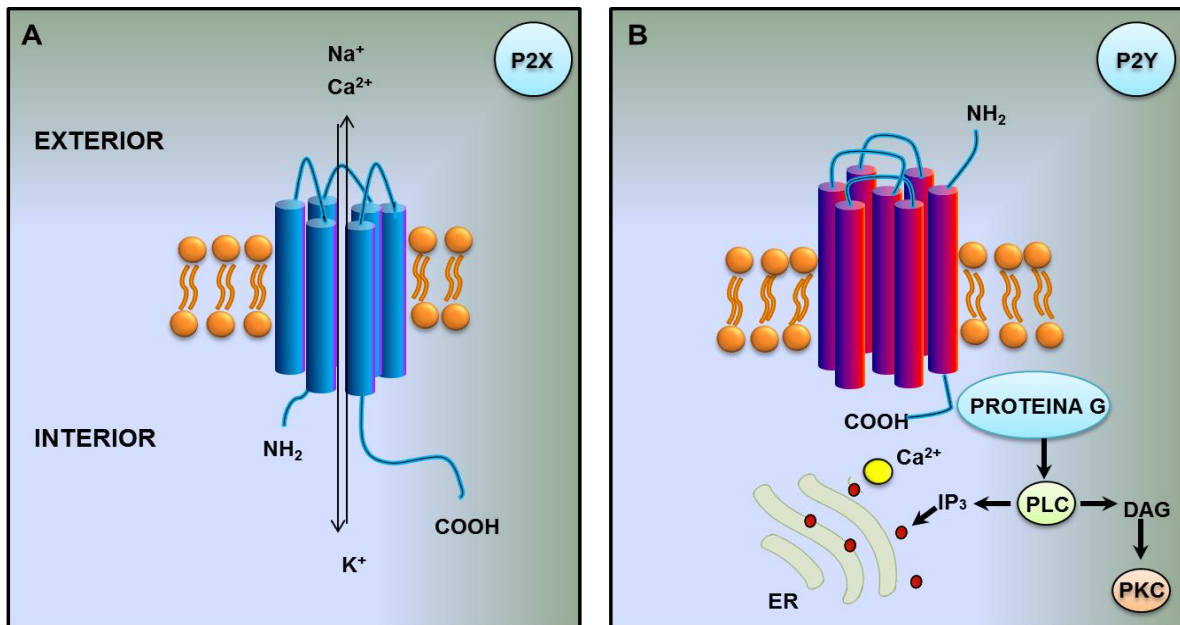


Figura 9. Estructura de receptores P2X y P2Y.

Agonistas de los receptores P2

Los receptores P2X responden principalmente al mononucleótido adenosina-5'-trifosfato (ATP) y sus análogos (3'-O-(4-benzoil) benzoil ATP (BzATP), α , β -metileno ATP (α , β -meATP), β , γ -metileno ATP (β , γ -meATP) y 2-metiltio ATP (2-MeSATP)), como ligandos activos. En base a su afinidad por los diferentes agonistas, los receptores P2X podrían ser clasificados en dos grupos. Por un lado, los receptores P2X1 y P2X3, los cuales presentan gran afinidad por el ATP (baja EC_{50}), activándose y desensibilizándose rápidamente, y, además, son activados también por α , β -meATP.

Otro grupo de receptores englobaría a P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, los cuales muestran menor afinidad por el ATP, desensibilización menos marcada (North, 2002; Gever *et al.*, 2006; Coddou *et al.*, 2011). Tanto el 2MeSATP (buen agonista de todos los receptores P2X, así como de algunos receptores P2Y) como el BzATP (que actúa

sobre algunos de los subtipos P2X) son análogos sintéticos que pueden activar receptores P2X.

Los receptores P2Y son menos restrictivos que los receptores P2X y se activan mediante ATP y sus análogos, y, además, por nucleótidos tales como ADP, UTP, o UDP. Las respuestas de los receptores P2Y dependen de su afinidad frente a los nucleótidos de adenina y uridina, y varían en potencia, dependiendo de la especie. Los receptores P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ son receptores activados de manera selectiva por nucleótidos de adenina (ATP/ADP). El agonista natural más potente de P2Y₁ es ADP, presentando el compuesto sintético 2-Metiltio-ADP (2-MeSADP) una afinidad por el receptor diez veces mayor que ADP (Waldo *et al.*, 2004). Otro grupo de receptores son P2Y₂ y P2Y₄, los cuales son activados por nucleótidos de adenina y de uracilo. En el caso de P2Y₂, tanto UTP como ATP son agonistas con igual potencia, mientras que UTP es 50 veces más potente que ATP para P2Y₄. El receptor P2Y₆ es específico para pirimidinas, selectivo de UDP, y P2Y₁₂ y P2Y₁₃ son activados por ADP y derivados. P2Y₁₄ es activado por UDP-glucosa y otros UDP-azúcares (Abbracchio *et al.*, 2006; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b).

Además de los nucleótidos comentados, los receptores P2X y P2Y son susceptibles a la activación mediante dinucleótidos tales como los diadenosina polifosfatos, cuya estructura permite su unión a diferentes receptores purinérgicos (véase apartado 5.3). La selectividad de los receptores P2 por estas moléculas depende de la longitud de la cadena de los fosfatos de las mismas, presentando diferentes perfiles farmacológicos, así como diferente potencia de acción (Tablas 3 y 4).

Antagonistas de los receptores P2

Ante la falta de selectividad de antagonistas como suramina, PPADS o RB-2 (reactivo azul 2), no pudiendo discriminar entre los diferentes receptores P2X ni siquiera entre los dos subtipos P2, se han desarrollado análogos de los mismos con efectos más específicos. Modificando la estructura de suramina y PPADS se han generado antagonistas con mayor selectividad y/o potencia (Gever *et al.*, 2006; Lalo *et al.*, 2008). Así, por ejemplo, en la actualidad se dispone de antagonistas más específicos como: NF449 y RO-1 para P2X₁; PSB-1011 para P2X₂; A317491, RO-3 y AF-353 para P2X₃ y P2X_{2/3}; 5-BDBD para P2X₄, y A740003, A438079, A804598, GSK314181A, AZ10606120, AZ11645373, AZD-9056 y CE-224535 en el caso de P2X₇ (Tabla 3).

En cuanto a la selectividad antagonista de los receptores P2Y, aparte de los antagonistas disponibles no selectivos de un único receptor, previamente comentados, suramina, PPADS y RB-2, se han desarrollado también antagonistas de carácter selectivo para facilitar la identificación precisa de receptores P2Y. Por ejemplo, el compuesto MRS2179 es un antagonista potente y selectivo de P2Y₁, y el MRS2567 (análogo de DIDS 1,2-di-(4-isotiocianatofenil) etano) que inhibe el receptor P2Y₆ sin ningún efecto sobre P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₁ (Mamedova *et al.*, 2004). Se ha visto que los flavonoides bloquean el receptor nativo P2Y₂ en células NG108-15 de manera no competitiva (Kaulich *et al.*, 2003). Otros compuesto, como el agente antiplaquetario clopidogrel (tienopiridina), es un profármaco cuyo mecanismo de acción está relacionado con el receptor del adenosina difosfato (ADP) en las membranas celulares, y parece actuar como antagonista selectivo de P2Y₁₂ después del metabolismo hepático (Marteau *et al.*, 2003).

Tabla 3. Receptores P2X homoméricos: principales agonistas, antagonistas y perfiles farmacológicos de los diadenosina polifosfatos. Los datos han sido obtenidos de (Guzman-Aranguez *et al.*, 2007; Syed, 2012; Burnstock, 2014).

RECEPTOR	AGONISTAS PRINCIPALES (EC ₅₀)	ANTAGONISTAS	PERFILES FARMACOLÓGICOS PARA LOS DIADENOSINA POLIFOSFATOS (PD ₂)
P2X1	BzATP > Lβ,γ-meATP ≥ ATP = 2-MeSATP = α,β-meATP; PAPET-ATP	NF449 > IP5I > TNP-ATP > RO 0437626 > NF110 > NF279, NF023, RO1; MRS2159 > PPADS; Suramina = PPADS	Ap ₆ A > Ap ₅ A > Ap ₄ A > Ap ₃ A (Ap ₅ A y Ap ₄ A, agonistas parciales)
P2X2	ATP ≥ ATPγS ≥ 2-MeSATP >> α,β-meATP > β,γ-CF ₂ meATP; BzATP	PSB-1011 > RB2 = NF279, isoPPADS > PPADS > Suramina, NF770, NF778, aminoglicósido; TNP-ATP	Ap ₄ A
P2X3	2-MeSATP ≥ ATP ≥ α,β-meATP; PAPET-ATP; BzATP	TNP-ATP, isoPPADS > A317491 > NF110 > PPADS, Ip ₅ I, rojo fenol, RO4, RN1838, espinorfina, AF353; RO85	Ap ₃ A > Ap ₄ A > Ap ₅ A > Ap ₆ A
P2X4	ATP > α,β-meATP, CTP, 2-MeSATP; BzATP Potenciación por Ivermectina, y Azul de cibacron y RB-2	5-BDBD >> TNP-ATP, PPADS > BBG, Paroxetina, fenoltaleína, CORM2, fluoxetina	Ap ₆ A > Ap ₄ A
P2X5	ATP = 2-MeSATP = ATPγS >> α,β-meATP; GTP	BBG > PPADS > Suramina > RB-2; TNP-ATP	Ap ₄ A > Ap ₅ A > Ap ₆ A > Ap ₃ A
P2X6	Sólo como heteromultímero	Sólo como heteromultímero	Ap ₄ A
P2X7	BzATP >> ATP ≥ 2-MeSATP >> α,β-meATP = βγ-meATP	A-740003 > A-438079; BBG; A-804598; AZ11645373; A-847227; AZ-10606120; CBB; GSK314181A; GSK1482160; Suramina, PPADS, KN-62 (no competitivos); KN-04; MRS2427; RN-6189; GSK1370319; AZ-109056; AZD-9056; CE-224535; oxATP	Todos [a concentración > 1 mM]

Tabla 4. Receptores P2Y (principales agonistas, antagonistas, y perfiles farmacológicos de los diadenosina polifosfatos. Los datos han sido obtenidos de (Guzman-Aranguez *et al.*, 2007; Jacobson *et al.*, 2010; Burnstock, 2014).

RECEPTOR	AGONISTAS PRINCIPALES (EC ₅₀)	ANTAGONISTAS	PERFILES FARMACOLÓGICOS PARA LOS DIADENOSINA POLIFOSFATOS (PD ₂)
P2Y₁	MRS2365 > 2MeSADP = Ap ₅ (βγ) >> ADPβS > ATP > 2MeSATP = ADP	MRS 2500 > MRS 2279 > MRS 2179 >> Suramina > PPADS; PIT	Ap ₃ A>Ap ₄ A>Ap ₅ A=Ap ₆ A>>Ap ₂ A
P2Y₂	2-S-UTP > UTP, MRS2698 > ATP, INS 365 > INS 37217, UTPγS > ATPγS, MRS2768, Up ₄ -fenil ester	AR-C 126313 > Suramina> RB-2, PSB-716, MRS2576	Ap ₄ A>Ap ₅ A>Ap ₆ A>Ap ₃ A
P2Y₄	2-N3-dUTP > UTPγS, UTP ≥ ATP ≥ Ap ₄ A, INS365; INS31217; CTP; ITP	(ATP en humano) > RB-2 > Suramina, MRS2577, PPADS	---
P2Y₆	MRS 2693 > UDPβS, PBS0474 > INS 48823, Up ₃ U, fenacil-UDP >> UDP > UTP >> ATP, α,β-meUDP; IDP	MRS2578 > RB-2, PPADS, MRS2567, MRS2575 (humano); Suramina	Ap ₅ A>Ap ₃ A [a concentración > 1 mM]
P2Y₁₁	ATPγS AR-C67085MX > BzATP ≥ ATP, NF546, NAD ⁺ , NAADP ⁺ ; 2MeSATP	NF157 > Suramina > RB-2, 5'-AMPs, NF340, AMP-α-5	---
P2Y₁₂	2MeSADP = 2MeSATP >> ADP >> ATP, ADPβS	AR-C69931MX > AZD6140, INS50589 > RB-2 > 2MeSAMP, AR-C66096, CT50547, PSB0413, carba-nucleósidos, MRS2395, AR-C67085; Clopidogrel; Ticlopidina; Suramina; INS49266	---
P2Y₁₃	ADP = 2MeSADP > 2MeSATP, ATP	AR-C69931MX > AR-C67085 > MRS2211, 2MeSAMP; PPADS > Suramina	Ap ₄ A (antagonista, pA ₂)
P2Y₁₄	MRS2690 > UDP > UDP-glucosa > UDP-galactosa >UDP Glucurónico > UDP-N-acetilglucosamina	No conocidos	---

5.2. Receptores P2 en el ojo

El patrón de expresión de los receptores P2 varía dependiendo del tejido y tipo celular (Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock, 2007a; Burnstock, 2007b). En el ojo, se han descrito receptores purinérgicos P2 en diferentes estructuras oculares, tales como el epitelio corneal y conjuntival, el endotelio corneal, la glándula lagrimal, los procesos ciliares, la malla trabecular, y diferentes partes de la retina (Guzman-Aranguez *et al.*, 2013).

5.2.1. Receptores P2 en la superficie ocular

Distintos receptores P2X y P2Y se expresan en las distintas partes de la superficie ocular, siendo el más abundante el subtipo P2Y₂ identificado en áreas como el epitelio y endotelio corneal, el epitelio conjuntival y la glándula lagrimal (Cowlen *et al.*, 2003; Pintor *et al.*, 2004b) (Tabla 5). Entre las funciones asignadas a los receptores P2X y P2Y, cabe destacar su implicación en el proceso de cicatrización corneal (P2Y₂ produce una aceleración de la re-epitelización y proliferación corneal, mientras que P2Y₆ ralentiza el proceso), estimulación de la secreción lagrimal (a través de P2Y₂) y migración epitelial corneal y organización estromal, mediante el receptor P2X₇.

Tabla 5. Receptores purinérgicos presentes en la superficie ocular. Tabla adaptada (Guzman-Aranguez *et al.*, 2013).

SUBTIPOS P2	ESPECIES	FUNCIÓN	REFERENCIAS
EPITELIO CORNEAL			
P2X5	Rata	No determinado	(Groschel-Stewart <i>et al.</i> , 1999)
P2X7	Rata, ratón y humano	Migración epitelial corneal y organización estromal	(Groschel-Stewart <i>et al.</i> , 1999; Dutot <i>et al.</i> , 2008; Mayo <i>et al.</i> , 2008)
P2Y ₁ , P2Y ₄	Conejo, rata y humano	No determinado	(Klepeis <i>et al.</i> , 2004; Pintor <i>et al.</i> , 2004b)
P2Y ₂	Macaco, conejo, rata y humano	Aceleración de la re-epitelización y proliferación corneal	(Cowlen <i>et al.</i> , 2003; Klepeis <i>et al.</i> , 2004; Pintor <i>et al.</i> , 2004b; Crooke <i>et al.</i> , 2008; Mediero <i>et al.</i> , 2008; Mediero, 2010)
P2Y ₆	Conejo, rata y humano	Retraso de la re-epitelización e incremento de la proliferación corneal	(Klepeis <i>et al.</i> , 2004; Pintor <i>et al.</i> , 2004b)
P2Y ₁₁	Conejo y humano	No determinado	(Klepeis <i>et al.</i> , 2004)
EPITELIO CONJUNTIVAL			
P2X7	Humano	Permeabilización de membrana asociada con patología iatrogénica	(Dutot <i>et al.</i> , 2008)
P2Y ₂	Conejo, macaco y humano	Estimulación de secreción lagrimal	(Jumblatt <i>et al.</i> , 1998; Cowlen <i>et al.</i> , 2003)
ENDOTELIO CORNEAL			
P2Y ₁ , P2Y ₂	Bovino	Incremento de la concentración de calcio intracelular	(Jumblatt <i>et al.</i> , 1998; Srinivas <i>et al.</i> , 1998; Cowlen <i>et al.</i> , 2003; Gomes <i>et al.</i> , 2005)
GLÁNDULA LAGRIMAL			
P2X1, P2X2, P2X4, P2X6	Rata	No determinado	(Hodges <i>et al.</i> , 2011)
P2X3, P2X7	Rata	Incremento de la concentración de calcio intracelular y la secreción de proteínas	(Hodges <i>et al.</i> , 2009; Novak <i>et al.</i> , 2010; Hodges <i>et al.</i> , 2011)
P2Y ₁ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₃	Rata	Incremento de la concentración de calcio intracelular	(Ohtomo <i>et al.</i> , 2011)

5.2.2. Receptores P2 en cámara anterior y posterior

Los receptores purinérgicos P2X y P2Y están presentes en los procesos ciliares y la malla trabecular, lo que sugiere que estos compuestos contribuyen a las funciones fisiológicas en estas áreas, tales como el control de la presión intraocular (PIO). En concreto, a nivel de los procesos ciliares, se ha demostrado el efecto hipertensor tras la activación de los receptores P2Y₂ por ATP y sus análogos, 2-metiltio-ATP y ATPγS [adenosina-5'-O-(3-tiotrifosfato)] (Peral *et al.*, 2009)) o UTP (Markovskaya *et al.*, 2008) y sus análogos 2-tioUTP, uridina-5'-O-(3-tiotrifosfato) (Martin-Gil *et al.*, 2012). Asimismo, la estimulación que UDP produce en otros receptores purinérgicos como el P2Y₆ presentes en los vasos sanguíneos de los procesos ciliares produce vasoconstricción, disminución en la producción de humor acuoso y disminución de la PIO (Markovskaya *et al.*, 2008). A nivel de la malla trabecular, existen receptores P2X y P2Y, cuya activación facilita la salida del humor acuoso, produciéndose un efecto hipotensor, como sucede tras la activación de los receptores P2Y₁ (Crosson *et al.*, 2004; Pintor *et al.*, 2004b; Soto *et al.*, 2005; Chow *et al.*, 2007).

En el cristalino, el estrés osmótico produce la activación de TRPV4, con la consecuente liberación de ATP desde los hemicanales de panexina/conexina. Dicho ATP liberado estimula a su vez receptores P2Y que activan la bomba Na, K-ATPasa en el epitelio del cristalino para mantener la transparencia de la lente (Sanderson *et al.*, 2014).

5.2.3. Receptores P2 en la retina

Se ha determinado la presencia de diferentes receptores P2 en la mayoría de los tipos de neuronas y células gliales en la retina de mamíferos, y aunque su papel no está bien determinado, existen estudios que muestran la activación de algunos receptores P2, tales como P2X7 (Vessey *et al.*, 2012), P2X2 (Kaneda *et al.*, 2010), y P2Y₄ (Ward *et al.*, 2008). En la retina, gran parte de los estudios se han centrado en analizar el papel del receptor P2X7 en esta localización. Dentro de las acciones atribuidas a P2X7, cabe señalar su implicación en la apoptosis selectiva de fotorreceptores (Franke *et al.*, 2005; Puthussery *et al.*, 2009; Notomi *et al.*, 2011), la apoptosis de células ganglionares de la retina (Zhang *et al.*, 2006), la posible apoptosis en el epitelio pigmentado de la retina (Dutot *et al.*, 2008), la acción mitogénica de ATP sobre la tasa de síntesis de DNA en cultivos celulares humanos de células de Müller (Bringmann *et al.*, 2001), así como la contracción de pericitos retinianos (Kawamura *et al.*, 2003). Por otra parte, también ha sido posible demostrar las funciones que ejercen otros receptores de tipo P2Y. Así, por ejemplo, P2Y₁ contribuye a la homeostasis del volumen del espacio extracelular, previniendo la hinchazón osmótica de las células de Müller (Uckermann *et al.*, 2006; Iandiev *et al.*, 2007; Wurm *et al.*, 2010).

La estimulación del receptor P2Y₄, al igual que P2X7, puede inducir contracciones de los pericitos retinianos (Kawamura *et al.*, 2003), regulando la actividad del canal de cloro activado por Ca²⁺. P2Y₄, además, inhibe la formación de poros y la muerte celular microvascular producida por P2X en la diabetes retiniana (Sugiyama *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que P2Y₂ puede ser una buena diana terapéutica en el desprendimiento de retina, donde se produce una desregulación transepitelial de

nutrientes, agua e iones, acumulándose en el espacio subretiniano. La activación del receptor $P2Y_2$, mediante ATP o UTP, produce regulación del flujo de fluidos en la dirección apical a la baso-lateral en monocapas de epitelio pigmentario de retina en bovino y rata (Peterson *et al.*, 1997; Maminishkis *et al.*, 2002). Inyecciones intravítreas con INS37217, agonista de $P2Y_2$, mejoran la reabsorción del fluido de la retina en modelos degenerativos de retina con conejo y rata (Maminishkis *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2002). Por otra parte, el aumento de la secreción de IL-8, cuya producción anormal puede estar involucrada en una variedad de procesos patológicos de la retina (Penfold *et al.*, 2001), está mediada a través de los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_6$ (Relvas *et al.*, 2009).

5.3. Nucleótidos: su identificación en las secreciones oculares

Los nucleótidos (tanto mononucleótidos como dinucleótidos) se han identificado en distintas secreciones oculares, tales como la lágrima y el humor acuoso (Mitchell *et al.*, 1998; Pintor *et al.*, 2002a; Pintor *et al.*, 2002b).

Dentro de los dinucleótidos, destaca la identificación de los diadenosina polifosfatos en el ojo. Estos compuestos son dinucleótidos de adenina, formados por dos moléculas de adenosina unidas en las posiciones 5' por un número variable de fosfatos que pueden oscilar entre 2 y 7 (abreviados como Ap_nA , $n=2-7$) (Miras-Portugal *et al.*, 1999). Los diadenosina polifosfatos se identificaron en primer lugar como nucleótidos citosólicos, y posteriormente como mensajeros extracelulares, conociéndose seis dinucleótidos de adenina (Ap_2A , Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A , Ap_6A y Ap_7A), identificados y almacenados en tejidos biológicos tales como las plaquetas (Flodgaard *et al.*, 1982; Luthje *et al.*, 1983), los gránulos cromafines medulares suprarrenales (Rodríguez del Castillo *et al.*, 1988; Castro *et al.*, 1990; Pintor *et al.*, 1991; Pintor *et al.*,

1992) y el sistema nervioso central (Pintor *et al.*, 1992; Zimmermann *et al.*, 1993; Klishin *et al.*, 1994; Pivorun *et al.*, 1996).

En secreciones oculares como la lágrima, se ha detectado la presencia de Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A en lágrima humana y de conejo (Ap₃A no se identificó en este último modelo), mediante cromatografía líquida de alta resolución (Pintor *et al.*, 2002a; Pintor *et al.*, 2002b), siendo Ap₄A el más abundante.

Estos diadenosín polifosfato pueden ser liberados a la lágrima como consecuencia de la ruptura celular, exocitosis neuronal, o dicha liberación puede deberse al estrés mecánico producido en el epitelio de la córnea (Srinivas *et al.*, 2002). En este sentido, existen evidencias que apuntan a una liberación mecánica de los nucleótidos como consecuencia del efecto palpebral en el epitelio corneal, detectándose una mayor liberación de los mismos al incrementarse la frecuencia de parpadeo (Carracedo *et al.*, 2013).

Además, se ha detectado el incremento en la concentración de dinucleótidos en la lágrima de pacientes con ojo seco, en los cuales un aumento en la frecuencia de parpadeo es un signo típico de sequedad ocular, producida para compensar la inestabilidad lagrimal (Tsubota *et al.*, 1996). En concreto, en estudios realizados en pacientes con ojo seco, se detectaron niveles 5, 100 y 42 veces superiores de Ap₄A en pacientes con ojo seco sintomáticos no Sjögren con producción de lágrima normal, pacientes con ojo seco sintomáticos no Sjögren con producción de lágrima baja, y baja) y en pacientes con ojo seco Sjögren, respectivamente, en comparación con individuos normales (Peral *et al.*, 2006; Carracedo *et al.*, 2010). Se estudiaron también los niveles del dinucleótido Ap₅A, aumentando los mismos 1.5, 345 y 595 veces en las mismas situaciones que las especificadas para Ap₄A (Peral *et al.*, 2006; Carracedo *et al.*, 2010). Debido a este aumento de los diadenosina polifosfatos en la lágrima de

pacientes con la patología de ojo seco, se han propuesto estos dinucleótidos como potenciales biomarcadores moleculares de esta enfermedad (Pintor, 2007).

El humor acuoso es un líquido transparente que aporta nutrientes a las estructuras intraoculares avasculares (como son la córnea y el cristalino). Es producido en los procesos ciliares y es drenado a través de la malla trabecular, el canal de Schlemm y las venas episclerales (To *et al.*, 2002). En esta secreción ocular también se ha detectado la presencia de dinucleótidos. Así, en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda, se identificaron los dinucleótidos Ap₄A (0.34 µM) y Ap₅A (0.08 µM) (Pintor *et al.*, 2003b), siendo estos valores de concentración más bajos que los encontrados en el caso de mononucleótidos como AMP, ADP y ATP (10.4 µM, 1.9 µM y 1.0 µM, respectivamente) (Pintor *et al.*, 2003b).

Por otro lado, en el humor acuoso de pacientes con glaucoma, se descubrieron niveles 14 y 15 veces superiores de ATP y Ap₄A, respectivamente, en comparación con individuos en ausencia de patología (Castany *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011), lo cual sugiere la implicación de estos compuestos en la patología glaucomatosa.

5.3.1. Ap₄A y su implicación biológica en el ojo

La identificación de nucleótidos y dinucleótidos en las secreciones oculares, así como la presencia de distintos receptores purinérgicos en las diversas estructuras oculares, sugiere la implicación de estos compuestos en la fisiología y bioquímica ocular. En particular, destaca el papel del Ap₄A entre todos estos compuestos.

5.3.1.1. Estructura de Ap₄A

El diadenosina tetrafosfato, P¹, P⁴-Di (adenosina-5') tetrafosfato o abreviadamente Ap₄A, es un dinucleótido perteneciente a la familia de los dinucleósido polifosfatos. Esta molécula comprende dos nucleósidos que contienen anillos de ribosa y adenina unidos por una cadena de cuatro polifosfatos a través de enlaces fosfo-éster en la posición 5' de dos moléculas de ribosa. El Ap₄A puede presentar tres conformaciones principales: apilado, plegado, y abierto, dependiendo de las condiciones de pH, temperatura e iones metálicos. La estructura *apilada* hace referencia al apilamiento de los anillos de adenina, mientras que la cadena de fosfato se dobla. El plegado *unstacked* implica que los fosfatos se pliegan pero los anillos de adenina no se apilan y señalan direcciones opuestas (Figura 10). La conformación *abierta* presenta la molécula con la cadena de fosfatos completamente extendidos y los anillos de purina desapilados. Las diferentes conformaciones determinarán la habilidad del Ap₄A para unirse a diferentes receptores P2. En solución y en condiciones de pH fisiológico, Ap₄A adopta una conformación plegada simétrica con apilamiento de sus bases (Mayo *et al.*, 1990), en la que se estabiliza la molécula entera a través de interacciones electrostáticas entre la carga negativa de los grupos fosfato y los anillos de adenina parcialmente cargados positivamente.

En condiciones ligeramente ácidas (pH 4-5) el Ap₄A puede presentar una conformación *unstacked*, y a pH<3 los grupos fosfato se protonan y desaparece la atracción entre los fosfatos y los anillos de adenina, pasando la molécula a tener una conformación abierta. Además, cambios significativos en el pH modifican la actividad de los receptores P2 a los que se unen los diadenosina polifosfatos (King *et al.*, 1996). Cada uno de los fosfatos de los diadenosina polifosfatos posee una carga negativa, la cual al formar complejos con cationes divalentes afecta a la unión de dicha molécula con el receptor. Por ejemplo, se ha comprobado que Mg²⁺ es capaz de unirse a esas

cargas negativas de los fosfatos para formar complejos con el Ap₄A (Westkaemper, 1987). Todo lo anterior puede explicar el hecho de que los diadenosina polifosfatos no estimulen a los mismos receptores, dependiendo dicha estimulación de las condiciones ambientales, del pH, de la longitud de la cadena de fosfatos y de la unión a cationes divalentes.

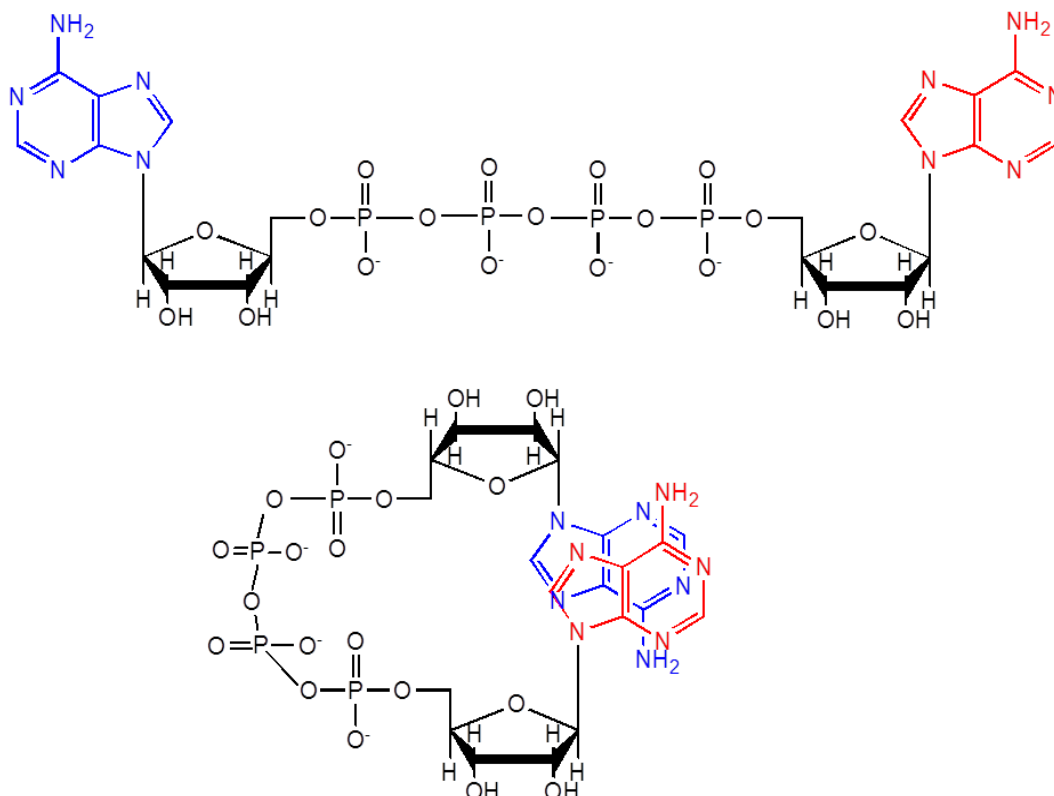


Figura 10. Representación de las estructuras de Ap₄A: abierta (arriba) y apilada o *stacked* (abajo).

5.3.2. Principales funciones biológicas de Ap₄A en el ojo

Ap₄A ejerce diversas funciones en el ojo, participando en procesos como son la secreción y composición lagrimal, la cicatrización y la presión intraocular, todo ello mediante la activación de receptores P2X y P2Y (Guzman-Aranguez *et al.*, 2007) (Figura 11).

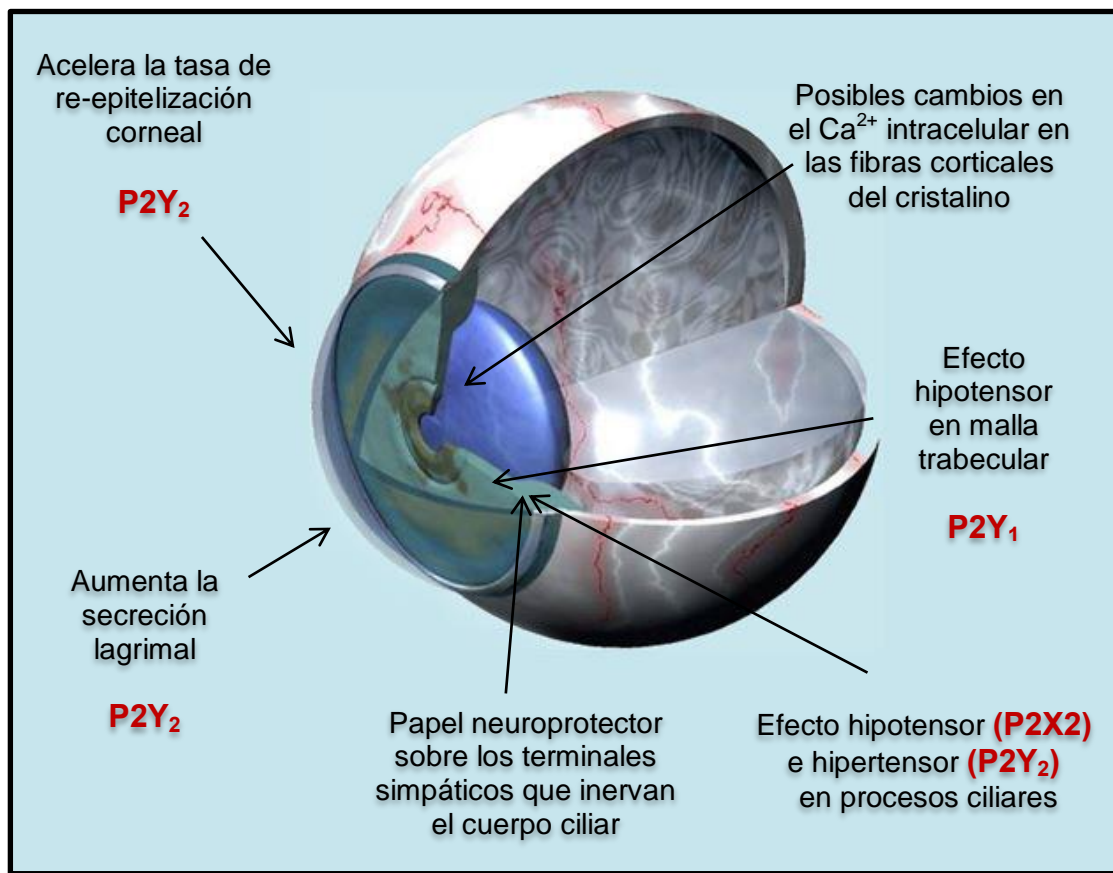


Figura 11. Papel biológico de Ap₄A sobre la fisiología ocular.

A continuación se describen los distintos efectos que ejerce dicho Ap₄A sobre la fisiología ocular.

5.3.2.1. Papel biológico de Ap₄A en la superficie ocular

Acción del dinucleótido Ap₄A sobre la secreción y composición lagrimal

La producción lagrimal es uno de los procesos regulados por nucleótidos y dinucleótidos extracelulares en la superficie ocular de mamíferos y humanos. En conejos albinos de Nueva Zelanda, Ap₄A aumenta la producción de lágrima un 60%, en comparación con los valores basales, y este efecto parece estar mediado por receptores P2Y₂ (Pintor *et al.*, 2002b). Ap₄A contribuye a la secreción lagrimal inducida

por carbacol (agonista colinérgico), cuyo efecto combinado con ATP, ayuda a mantener la humectación y salud de la superficie ocular, como muestran estudios recientes (Fonseca *et al.*, 2015).

Asimismo, otros agonistas del receptor P2Y₂ también aumentan la producción de lágrima en mamíferos. Por ejemplo, en estudios realizados en conejo, los dinucleótidos Ap₅A y Ap₆A produjeron un aumento del 20% en la producción de lágrima (Pintor *et al.*, 2002b) y los mononucleótidos UTP y ATP aumentaron alrededor de cuatro veces la secreción lagrimal de dichos animales (Murakami *et al.*, 2000); otros estudios en modelo de rata, reportaron un aumento transitorio de 1.5 veces en la secreción lagrimal debido a la acción del dinucleótido diuridina tetrafosfato (Up₄U, INS365) (Fujihara *et al.*, 2001).

La aplicación de nucleótidos no sólo altera el volumen (agua y electrolitos) sino que también afecta a la composición de la lágrima, modificando el contenido proteico de la misma. Por ejemplo, agonistas de P2Y₂ como ATP y UTP, así como el dinucleótido de diuridina tetrafosfato Up₄U (INS365 o *Diquafosol*, de Santen Pharmaceutical, comercializado actualmente como secretagogo para el tratamiento de ojo seco (Nichols *et al.*, 2004), aumentan la secreción de mucinas en las células *Goblet* conjuntivales en animales vivos (Fujihara *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2003).

Acción del dinucleótido Ap₄A sobre la migración y proliferación celular asociadas al proceso de cicatrización corneal

El epitelio corneal es susceptible de ser dañado por diversos factores debido a su expuesta localización en el ojo, siendo regenerado mediante procesos de cicatrización (Dupps and Wilson, 2006). Se ha demostrado la acción del Ap₄A en la

estimulación de procesos de reparación de heridas epiteliales corneales (Pintor *et al.*, 2004a; Mediero *et al.*, 2008). En experimentos *in vivo* donde se instiló Ap₄A en conejos albinos de Nueva Zelanda, el dinucleótido produjo un aumento del 130% en la tasa de cicatrización (Pintor *et al.*, 2004a). En consonancia con este hallazgo, Ap₄A también aceleró la tasa de re-epitelización en cultivos primarios de células epiteliales corneales inmortalizadas de conejo. Este efecto parece mediado por receptores P2Y₂, como demostraron estudios farmacológicos en los que se utilizaron diferentes antagonistas de receptores P2 (Pintor *et al.*, 2004a; Mediero *et al.*, 2006). Esta idea fue confirmada posteriormente por el silenciamiento específico del receptor P2Y₂ utilizando RNA de interferencia pequeño (Crooke *et al.*, 2009). Además, se demostró que el efecto sobre la cicatrización corneal inducido por la estimulación del receptor P2Y₂ era mediado por la activación de la cascada de señalización extracelular mediada por quinasas (ERK), y la cascada de proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCK-1) (Mediero *et al.*, 2008).

Como era de esperar, otros agonistas del receptor P2Y₂ (tales como los mononucleótidos ATP y UTP) también estimulan la migración celular durante el proceso de reepitelización corneal, tanto *in vitro* como *in vivo* e inducen la migración celular (Pintor *et al.*, 2004a; Mediero *et al.*, 2008). En particular, UTP incrementó la tasa de cicatrización un 168% en conejos albinos de Nueva Zelanda, un efecto mediado por la activación del receptor P2Y₂ (Pintor *et al.*, 2004a; Mediero *et al.*, 2006).

Por el contrario, se observó un efecto opuesto con los dinucleótidos Ap₃A y Ap₅A, ya que produjeron un retraso en el proceso de cicatrización corneal mediado por la estimulación del receptor P2Y₆ (Mediero *et al.*, 2006).

Asimismo, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que después del tratamiento con Ap₄A, la proliferación de células epiteliales de la córnea aumentó a las 24 y 36 horas (Mediero, 2010). Dado que el paso final en el proceso de cicatrización

corneal es la iniciación del proceso mitótico de proliferación celular para restaurar la capa epitelial de la córnea, el Ap_4A contribuiría no sólo a la fase de migración, sino también a esta etapa proliferativa. Nuevamente, este efecto se produce mediante la activación del receptor $P2Y_2$.

5.3.2.2. Papel biológico de Ap_4A en la cámara anterior y posterior del ojo

Una de las funciones más interesantes del dinucleótido Ap_4A dentro del ojo es su capacidad de regular la presión intraocular (Guzman-Aranguez *et al.*, 2007), induciendo una reducción del 29.6% en la PIO de conejos (Pintor *et al.*, 2003b). Esta acción está presumiblemente mediada por receptores $P2X$, en concreto, $P2X_2$, los cuales están presentes en las terminales nerviosas que inervan los procesos ciliares. La activación de estos receptores mediante Ap_4A podría facilitar la liberación de más acetilcolina, produciendo la contracción del músculo ciliar, la apertura del ángulo irido-corneal y reduciendo la resistencia a la salida del flujo de humor acuoso (Pintor, 2005). Se ha descrito también que el efecto hipotensor del Ap_4A puede ser debido a la activación de receptores $P2Y_1$ presentes en la malla trabecular, produciendo un incremento en el flujo del humor acuoso (Soto *et al.*, 2005). Por el contrario, Ap_4A causa un efecto hipertensor en los procesos ciliares mediante el aumento de la expresión de la proteína acuoporina-1, aumentando el tráfico de la misma a la membrana plasmática de las células epiteliales ciliares. Este hecho produce la activación de receptores $P2Y_2$ e incrementa la producción de humor acuoso, con el consiguiente aumento de la PIO (Martín-Gil.; Pintor, 2010; Martin-Gil, 2010).

Otros dinucleótidos, como los diinosina polifosfatos, también ejercen un efecto sobre la PIO en conejos normotensos, tanto aumentándola (diinosina pentafofato ó Ip_5I), como disminuyéndola (diinosina trifosfato y diinosina tetrafofato,

Ip₃I e Ip₄I, respectivamente), siendo Ip₄I el más eficaz en la reducción de la PIO (con un EC₅₀ de 0.63 µM) (Guzman-Aranguez *et al.*, 2012b).

Por otro lado, se ha propuesto un papel neuroprotector para el Ap₄A en la conservación de los terminales simpáticos que inervan el cuerpo ciliar frente a la degeneración inducida por la aplicación subconjuntival de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) la cual produce miosis, reflejos pupilares anormales, una caída brusca de la presión intraocular y la pérdida de marcaje con un marcador de neuronas simpáticas intraoculares (*vesicular monoamine transporter 2* o VMAT2, transportadores vesiculares de monoaminas-2) (Hoyle *et al.*, 2010). El diadenosin tetrafosfato puede prevenir la degeneración producida en los nervios intraoculares, y este hallazgo sugiere el posible papel del Ap₄A en intervenciones terapéuticas para prevenir el desarrollo del glaucoma asociado a enfermedades neurodegenerativas.

5.3.2.3. Papel biológico de Ap₄A en el cristalino

El epitelio del cristalino podría estar sometido a cambios producidos en la concentración de los dinucleótidos que se encuentran en el humor acuoso, el cual rodea a la lente. Se han detectado receptores P2Y (P2Y₁ y P2Y₂) mediante RT-PCR e hibridación *in situ* en el cristalino (Merriman-Smith *et al.*, 1998; Collison *et al.*, 2001; Cowlen *et al.*, 2003). Debido a que el Ap₄A es el dinucleótido más representativo en el humor acuoso, y conocida su capacidad de estimular ambos receptores, cambios en su concentración podrían alterar la concentración del Ca²⁺ intracelular de las fibras corticales del cristalino. Además, la movilización de calcio en el cristalino podría modular la actividad de diferentes canales de K⁺ (Rhodes *et al.*, 2003) que determinan el potencial de membrana del cristalino, y canales de Cl⁻ (Valverde *et al.*, 1992) que contribuyen a la regulación del volumen del cristalino y a su transparencia.

5.3.2.4. Papel biológico de Ap₄A en la retina

A pesar de la poca información en relación a la presencia de los dinucleótidos en esta estructura, se ha podido comprobar la eficacia de los dinucleótidos en procesos patológicos tales como el desprendimiento de retina. Así, estudios pre-clínicos realizados con el dinucleótido 2' deoxicitidina tetrafosfo uridina, dCp4U (INS37217) han comprobado cómo dicho dinucleótido, a través de la activación del receptor P2Y₂, estimula la reabsorción de líquido retiniano y mejora la reinserción de la retina en modelos de desprendimiento de retina en rata y conejo. Dichos estudios apoyan el uso de INS37217 en la resolución clínica del desprendimiento de retina y en la mejora de la recuperación funcional de esta estructura ocular (Maminishkis *et al.*, 2002; Nour *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta que Ap₄A también activa los receptores P2Y₂, es posible especular acerca de un comportamiento similar para este dinucleótido.

Hipótesis y objetivos



HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Como ya se ha comentado en la introducción, son diversas las acciones biológicas atribuidas a los nucleótidos y dinucleótidos en la superficie ocular. En este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento de otras posibles funciones que pueden ejercer estos compuestos en la superficie ocular, tales como su papel como modulador de proteínas lagrimales de acción protectora y su efecto sobre la función de barrera de la superficie ocular.

En referencia a su posible acción sobre proteínas de la lágrima, estudios previos han determinado la capacidad de incrementar el volumen lagrimal y la secreción de mucinas por parte de nucleótidos y dinucleótidos que son agonistas del receptor P2Y₂. Por ello es posible sugerir que estos compuestos puedan también modificar la secreción de otras proteínas lagrimales, tales como la lisozima y la lactoferrina.

Con respecto a la función de barrera del epitelio corneal, existe aún hoy en día una falta de conocimiento sobre los posibles elementos que podrían contribuir a modular la función de barrera de la superficie ocular, pudiendo desempeñar un destacado papel en esta regulación los nucleótidos, en particular el Ap₄A. Existen distintas rutas de transducción de señales y segundos mensajeros (proteína quinasa C, proteína quinasa A, AMP cíclico, calcio...) que pueden regular el ensamblaje de las TJ en distintos epitelios. En el caso del epitelio corneal se ha demostrado la disrupción del ensamblaje de las uniones estrechas y, por tanto, la función de barrera de la

superficie corneal, en células epiteliales corneales humanas, mediante la activación de la cascada de las ERK 1/2 MAP quinasas (Wang *et al.*, 2004). Por otra parte, en estudios previos del grupo se ha demostrado la capacidad del nucleótido Ap₄A de activar esta ruta de señalización de las ERK 1/2 mediante la estimulación del receptor P2Y₂ en células de epitelio corneal de conejo (Mediero *et al.*, 2006; Mediero *et al.*, 2008).

Por ello, nuestra hipótesis de partida se basa en que la activación de receptores P2Y₂ presentes en la superficie corneal inducida por agonistas como el Ap₄A, desencadenaría la activación de la cascada de las ERK 1/2, lo cual podría entonces alterar el ensamblaje de las TJ del epitelio corneal. Este hecho afectaría la permeabilidad de barrera del epitelio corneal y podría tener importantes repercusiones en la entrada de fármacos de distintos tipos, como por ejemplo fármacos anti-glaucomatosos, al interior del ojo.

Por otra parte, niveles elevados de Ap₄A, como los detectados en el humor acuoso de pacientes con glaucoma (Castany *et al.*, 2011) podrían desencadenar cambios en las TJ del endotelio corneal, los cuales contribuirían a explicar el proceso de edematización observado en modelos animales glaucomatosos tales como el ratón DBA/2J.

2. Objetivos

1. Analizar si dinucleótidos agonistas del receptor $P2Y_2$ tales como el Ap_4A pueden modificar la secreción de proteínas lagrimales de acción antimicrobiana como la lisozima y la lactoferrina.

Para conocer si el Ap_4A es capaz de estimular la producción de dos de las proteínas antimicrobianas más relevantes de la lágrima (lisozima y lactoferrina) se realizarán ensayos mediante las técnicas de agar-agar y ELISA con tal fin. Las muestras de lágrima se obtendrán de conejos albinos de Nueva Zelanda, los cuales serán instilados con el dinucleótido, y se examinarán los posibles cambios en la concentración de estas proteínas.

2. Evaluar el efecto del Ap_4A y otros agonistas del receptor $P2Y_2$ en la función de barrera del epitelio corneal.

Para ello se analizará la posible modificación de la permeabilidad de la barrera mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial en células de epitelio corneal humano tras la exposición a estos compuestos. Asimismo, se examinarán los potenciales cambios en la distribución y expresión de las proteínas constituyentes de las TJ, evaluándose las rutas de señalización celular que median dichos cambios.

3. Analizar el efecto de la aplicación de Ap_4A en el acceso a cámara anterior de fármacos para el tratamiento del glaucoma y en la eficacia de los mismos.

Se aplicarán compuestos antiglaucomatosos (5-MCA-NAT, brimonidina y timolol) de manera individual o en combinación con Ap_4A evaluando si la aplicación del dinucleótido modifica la concentración de estos fármacos en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda, así como su acción hipotensora.

4. Estudiar si existe una correlación entre el proceso de edematización de la córnea observado en ratones glaucomatosos DBA/2J y la posible alteración de proteínas que forman las TJ tales como la proteína ZO-1, así como la posible contribución del Ap_4A en este proceso.

Con tal fin, se analizará la distribución de una de las proteínas más relevantes de las TJ (*zonula occludens-1* o ZO-1) mediante técnicas de inmunodetección, analizando la expresión de la misma en córneas de ratones C57BL/6 y DBA/2J de tres y quince meses de edad. A su vez, se analizarán los niveles proteicos de ZO-1 en dichos animales mediante Western Blot, así como los niveles de Ap_4A y de ATP en el humor acuoso de los ratones.

Materiales y métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Reactivos y productos químicos

En las siguientes tablas se detallan los principales reactivos, anticuerpos, equipos e instrumentación utilizados.

Tabla 6. Relación de los principales reactivos y compuestos químicos utilizados.

REACTIVOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS	PROVEEDOR
AGONISTAS RECEPTORES PURINÉRGICOS	
• ADP; Ap ₃ A; Ap ₄ A; Ap ₅ A; ATP; UDP; UTP	Sigma-Aldrich
ANTAGONISTAS RECEPTORES PURINÉRGICOS	
• PPADS y Suramina	Tocris
• RB-2	Sigma-Aldrich
AGONISTA RECEPTOR MT3	
• 5-MCA-NAT	Tocris
INHIBIDORES MAPK	
• U-0126	Sigma-Aldrich
CULTIVO CELULAR	
• CaCl ₂	Panreac
• DMEM F-12; EGF; BPE; K-SFM; FBS; tripsina-EDTA 0.05%; penicilina-estreptomicina	Invitrogen
• DMSO	Sigma-Aldrich
• Jet PRIME® DNA Transfection Reagent	Polyplus-transfection
• siRNA para P2Y ₂ (experimentos <i>in vitro</i>) • <i>Cocktail</i> con inhibidores de proteasas (1%) (<i>Halt Protease inhibitor cocktail plus</i>)	Thermo Scientific
• siRNA para P2Y ₂ (experimentos <i>in vivo</i>)	Ambion
• 2-Propanol	Merck
ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT	
• Aprotinina; azul de bromofenol; β-mercaptoetanol; glicina;	

leupeptina; NaF; Na ₃ VO ₄ ; trizma base; pepstatina A; PSA; PMSF; SDS; TEMED	Sigma-Aldrich
• Acrilamida-bis-acrilamida; Bradford; patrones de peso molecular conocido	Bio-Rad
• BSA; BCA <i>protein assay kit</i>	Thermo Scientific
• Metanol; Tween-20	Merck
• Sistema de detección quimioluminiscente; membranas de nitrocelulosa; películas quimioluminiscentes	Amersham
INMUNOCITOQUÍMICA/INMUNOHISTOQUÍMICA	
• Yoduro de propidio; <i>p</i> -formaldehído, triton™ X-100	Sigma-Aldrich
• Medio de montaje Vectashield	Vector Lab
• Medio de montaje lento DPX	Panreac
• NP-40™	Fluka
• Suero de burro; suero de cabra	Jackson
• Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura
H.P.L.C.	
• Acetonitrilo, metanol	Scharlau
• KH ₂ PO ₄	Merck
• TBA	Sigma-Aldrich
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	
• MTT	Sigma-Aldrich
ENSAYOS DE LÁGRIMA	
• Cloruro de lisozima de huevo de gallina; <i>Micrococcus lisodeikticus</i>	Sigma-Aldrich
• Kit de ELISA para lactoferrina	Emelca Bioscience
• Papeles circulares de filtro de 125 mm de diámetro	Whatman
• Tubos capilares heparinizados con sodio	Marienfeld
ENSAYOS CON COLORANTES	
• Azul de bromofenol	Panreac
• Azul de Evans	Sigma-Aldrich
• Hematoxilina	Panreac
FÁRMACOS ANTIGLAUCOMATOSOS	
• Tartrato de brimonidina (Alphagan®)	Allergan
• Timolol maleato	Sandoz
AGENTES ANESTÉSICOS Y PARA EUTANASIA	
• Clorhidrato de medetomidina (Domtor®, 1mg/ml)	Esteve
• Hidrocloruro de atipamezol (Antisedan®, 5 mg/ml)	

• Hidrocloruro de Xylacina (Rompun®) 2%	Bayer
• Ketamina (Ketamidor®, 100 mg/ml)	Richter pharma
• Pentobarbital sódico (Dolethal®, 200 mg/ml)	Vétoquinol
• Propofol (Lipuro®, 10 mg/ml)	Braun

1.2. Tampones utilizados para Western Blot, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

Tabla 7. Relación de los tampones utilizados.

TAMPONES	COMPOSICIÓN
TBS 10 X pH 7.6	• Trizma HCl (0.2M); NaCl (1.369 M), HCl 37%
PBS 10 X pH 7.3	• NaCl (1.37 mM); KCl (26.8 mM); Na ₂ HPO ₄ (81 mM)
LISIS	
Tampón de lisis RIPA (Lisis celular)	• NaCl (150 mM); Tris HCl (25 mM) pH 7.6; NP-40 (1%); deoxicolato de sodio (1%); SDS (0.1%); <i>cocktail</i> de inhibidores de proteasas (1%) (<i>Halt Protease inhibitor cocktail plus</i>)
Tampón de lisis RIPA (Lisis de tejido)	• Tris HCl (50 mM) pH 8.0; NaCl (150 mM); NP-40 (1%); deoxicolato de sodio (0.5%); SDS (0.1%); PMSF (1 mM); leupeptina (10 µg/ml); pepstatina (5 µg/ml); aprotinina (10 µg/ml); NaF (1 mM); Na ₃ VO ₄ (2 mM)
WESTERN BLOT	
Tampón de electroforesis 5X	• Tris (0.125 M); glicina (0.96 M); SDS (0.5%)
LB 3X	• Tris (195 mM) pH 6.8; SDS (9%); glicerol (30%); azul de bromofenol (0.02%); β-mercaptoetanol (15%)
LB 2X	• Tris (125 mM) pH 6.8; SDS (4 %); glicerol (20%); EDTA (15 mM), azul de bromofenol (0.004%); β-mercaptoetanol (10%)
Geles de acrilamida	• Tris (40 mM) pH 8.8; Tris (100 mM) pH 6.8; SDS (0.1%) pH 7.2; APS (15 mg/ml); TEMED (50 µl/ml)
Tampón para lavados	• PBS 1X; PBS 1X-Tween-20 al 0.05% (Células) • TBS 1X-Tween-20 al 0.1% (Tejido)
Solución de bloqueo	• PBS 1X con leche deslipidizada al 5% (Células) • TBS 1X-Tween-20 al 0.1% con leche deslipidizada al 5% (Tejido)
Solución para dilución anticuerpo primario	• PBS 1X-Tween-20 al 0.05% con leche deslipidizada al 2% (Células) • TBS 1X-Tween-20 al 0.1% con leche deslipidizada al 5% (Tejido)

Soluciones para dilución anticuerpo secundario	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 1X-Tween-20 al 0.05% con leche deslipidizada al 2% (Células) • TBS 1X-Tween-20 al 0.1% con leche deslipidizada al 0.25% (Tejido)
<i>Reprobing</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tris (62.5 mM) pH 6.8 ; SDS (2%); β-mercaptoetanol (100 mM)
INMUNOFLUORESCENCIA (IH: inmunohistoquímica; IC: inmunocitoquímica)	
Tampón para lavados	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 1X • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%
Permeabilización	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% (IC) • PBS 1X-Triton X-100 al 2% (IH, montaje en plano de la córnea de conejo) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.25% (IH, secciones de la córnea de ratón) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.5% (IH, montaje en plano de la córnea de ratón)
Solución de bloqueo	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% con suero de burro al 10% (IC) • PBS 1X-Triton X-100 al 2% con suero de cabra al 10% (IH, montaje en plano de la córnea de conejo) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, con suero de cabra al 10% (IH, secciones de la córnea de ratón) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% con suero de cabra al 5% (IH, montaje en plano de la córnea de ratón)
Anticuerpo primario	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% (IC) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.2% con suero de cabra al 2% (IH, montaje en plano de la córnea de conejo) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% con suero de cabra al 1% (IH, secciones de la córnea de ratón) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.2% (IH, montaje en plano de la córnea de ratón)
Anticuerpo secundario (IC, IH)	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% (IC) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% (IH, montaje en plano de la córnea de conejo) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% (IH, secciones de la córnea de ratón) • PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% (IH, montaje en plano de la córnea de ratón)

1.3. Anticuerpos empleados en el trabajo experimental

Tabla 8. Listado de anticuerpos utilizados.

ANTICUERPOS	COMPOSICIÓN	DILUCIÓN	PROVEEDOR
PRIMARIOS			
Anti-ZO-1 (mid) (~225 kDa) (Western Blot)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo	(1:500)	Invitrogen
Anti-ZO-1 (mid) (~225 kDa) (Inmunohistoquímica)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo	(1:125)	Invitrogen
Anti-occludina (C-term) (~65 kDa) (Inmunohistoquímica)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo	(1:100)	Invitrogen
Anti-Claudina-7 (~22 kDa) (Inmunohistoquímica)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo	(1:100)	Invitrogen
Anti-P2Y ₂ (~42 kDa)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo	(1:1.000)	Alomone
Anti-p-ERK (p-ERK 1: 44 kDa p-ERK 2: 42 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón	(1:500)	Sta. Cruz Biotechnology
Anti-ERK2 (42kDa, 44 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón	(1:1.000)	Sta. Cruz Biotechnology
Anti-GAPDH (~37 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón	(1:500)	Sta. Cruz Biotechnology
SECUNDARIOS (<i>Western Blot</i>)			
Anti-IgG de ratón-HRP	Obtenido en cabra. Conjugado con peroxidasa	(1:10.000)	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de conejo-HRP	Obtenido en cabra. Conjugado con peroxidasa	(1:10.000)	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de cabra-HRP	Obtenido en conejo. Conjugado con peroxidasa	(1:10.000)	Jackson Immunoresearch
SECUNDARIOS (<i>Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica</i>)			
Anti-IgG de conejo-FITC	Obtenido en cabra. Marcado con isotiocianato de fluoresceína	(1:200)	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de cabra-FITC	Obtenido en burro. Marcado con isotiocianato de fluoresceína	(1:200)	Jackson Immunoresearch

1.4. Instrumentación general

Tabla 9. Relación de los equipos e instrumentación general.

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	FABRICANTE
USO GENERAL	
• Autoclave	Trade Raypa
• Agitador de balanceo Sky Line Shaker S-4	Biogen
• Agitador orbital Bunsen	Nessler
• Balanza electrónica Mettler PJ 360	Mettler
• Balanza de precisión Mettler A5100	
• Campana de flujo laminar Hera Safe	Heraeus
• Centrífuga de sobremesa Picofuge	
• Centrífuga Labofuge 400	
• Centrífuga refrigerada Kubota 6500	Kubota
• Estufa	Memmert
• Lector de placas Power Wave XS2	Biotek
• Espectrofotómetro U-2001	Hitachi
• Microscopio Zeiss Axiovert 200M software LSM 5 Pascal	Zeiss
• Estereomicroscopio CL 1500 ECO	
• pH-metro GLP-21	Crison
• Pipetas automáticas	Eppendorf/Gilson
• Sonicator ultrasónico	Selecta
• Vórtex	Heidolph
CULTIVOS CELULARES	
• Baño termostático	Bunsen
• Botellas de cultivo de 75 cm ²	Cultek
• Cámara de Neubauer	Brand GMBH (Nessler)
• Incubador de cultivos celulares Heracell	Heraeus
• Filtros estériles de 0.2 µm	Pall Corporation
• Contenedor para congelación de células	Nalgene
• Jeringas de plástico estériles	BD Plastipak
• Placas 1, 6, 24 y 96 pocillos; viales de criocongelación	ThermoFisher Scientific
• Placas de Petri; raspadores celulares; pipetas de aspiración	Cultek
• Insertos <i>transwell</i> de cultivo celular de tereftalato de polietileno, de 12 mm de diámetro y poros de 0.4 µm	Corning
• <i>Pellet pestle Motor Cordless</i>	Kimble Chase

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	FABRICANTE
TEER	
<ul style="list-style-type: none"> Multímetro <i>Epithelial Voltohmmeter Evom²</i> 	World Precision Instruments
ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT	
<ul style="list-style-type: none"> Equipo de densitometrado Kodak Gel Logic 200 <i>Molecular Imaging Software</i> 	Kodak
<ul style="list-style-type: none"> Equipo de electroforesis <i>Mini protean® 3 Cell</i>; sistema de transferencia semi seca <i>Trans-Blot® SD Semy-Dry transfer cell</i> 	Bio-Rad
<ul style="list-style-type: none"> Calentador termobloque 	Labnet Internacional
H.P.L.C.	
<ul style="list-style-type: none"> Bomba de flujo isocrático (modelo 1515); columnas Novapack C18 (de 15 cm de longitud y diámetro de 0.4 cm); detector dual de absorbancia (modelo 2487) 	Waters
<ul style="list-style-type: none"> Inyector manual de muestras 	Rheodyne®
<ul style="list-style-type: none"> Jeringas Hamilton 	SGE Analytical Science
<ul style="list-style-type: none"> Sonicador ultrasónico 	Selecta
<ul style="list-style-type: none"> Precolumna (5 µm) <i>Kromaphase</i> 	Scharlau
INMUNOCITOQUÍMICA-INMUNOHISTOQUÍMICA	
<ul style="list-style-type: none"> Criostato Leica <i>CM1850</i> 	Leica
<ul style="list-style-type: none"> Dewar 	Dilvac®
<ul style="list-style-type: none"> Lab-Tek® <i>chamber slides</i> 	Nunc
<ul style="list-style-type: none"> Microscopio Zeiss Axiovert 200M, software LSM 5 Pascal 	Zeiss
<ul style="list-style-type: none"> Portas y cubreobjetos 	Thermo Scientific/Menzel-Gläser
EVALUACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR	
<ul style="list-style-type: none"> Lámpara de Hendidura Topcon <i>SL-8Z</i> 	Topcon
<ul style="list-style-type: none"> Biomicroscopio especular <i>SP 2000 P</i> 	Topcon
MEDICIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR	
<ul style="list-style-type: none"> Tonómetro de contacto Tono-Pen® XL 	Mentor
<ul style="list-style-type: none"> Tonómetros de rebote Tonovet® / Tonolab® 	Tiolat Oy

1.5. Programas, bases de datos y herramientas informáticas empleadas en el trabajo experimental

Tabla 10. Relación de los programas, bases de datos y herramientas informáticas empleadas en el trabajo experimental.

PROGRAMAS, BASES DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
<ul style="list-style-type: none"> Imaginet 2000 Topcon 	Evaluación de la salud ocular <i>in vivo</i>
<ul style="list-style-type: none"> Image J (v.1.37, NIH, EE.UU.) CorelDraw Graphic Suite 12.0 Adobe Photoshop 	Programas de procesamiento de imágenes
<ul style="list-style-type: none"> Instat; GraphPad Prism 6 	Estadística
<ul style="list-style-type: none"> Microcal Origin 7.0 Sigma-Plot 11.0 	Hoja de cálculo y gráficos
<ul style="list-style-type: none"> Pubmed 	Base de datos bibliográfica
<ul style="list-style-type: none"> Software LSM 5 Pascal 	Microscopía confocal
<ul style="list-style-type: none"> Kodak Gel Logic 200 Molecular Imaging Software 	Densitometrado de bandas (Western Blot)

2. Métodos

2.1. Modelos experimentales para los ensayos *in vitro* e *in vivo*

2.1.1. Modelo celular de epitelio corneal humano

Para la realización de los experimentos *in vitro* se ha empleado una línea establecida de células epiteliales limbocorneales humanas inmortalizadas (HCLE), cedidas generosamente por la Dra. Ilene Gipson (Gipson *et al.*, 2003) (Figura 12). Dicha línea celular procede de cultivos primarios del epitelio limbocorneal de donantes de córnea.

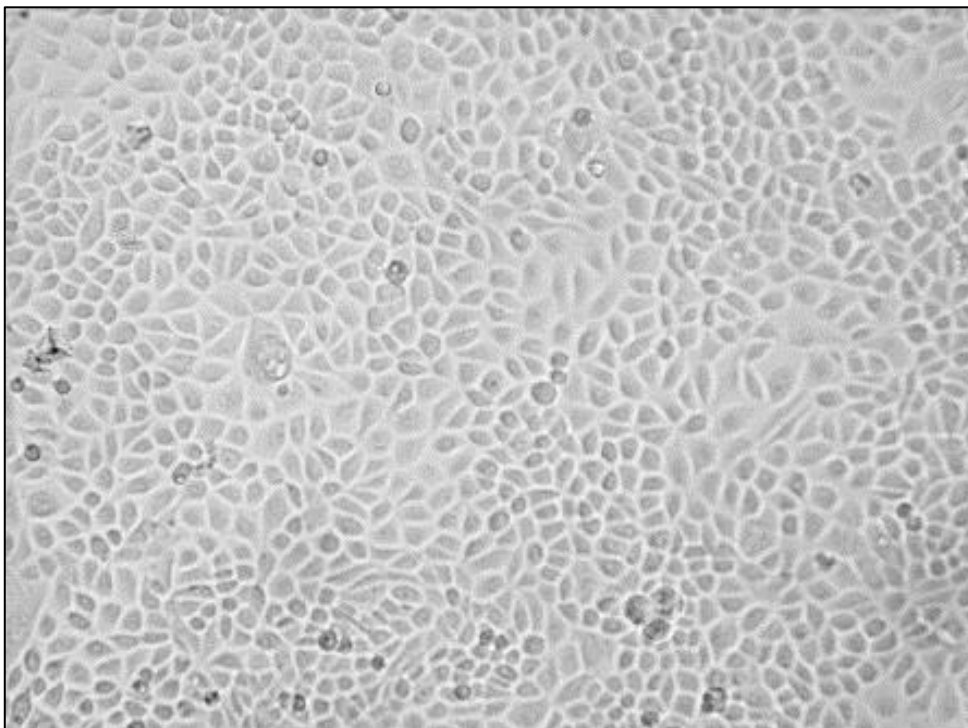


Figura 12. Células epiteliales limbocorneales humanas inmortalizadas (HCLE) (10 X).

Estos cultivos se transdujeron para expresar una proteína p53 dominante negativa y una proteína cdk4 mutante, la proteína resistente p16^{INK4A/Rb}, lo cual permitió a las células evitar el mecanismo de envejecimiento. Posteriormente, estas células se transdujeron con la telomerasa transcriptasa inversa (abreviadamente,

hTERT en humanos), subunidad catalítica de la telomerasa humana, lo que les permitió conservar sus telómeros y de esta forma dividirse indefinidamente. La línea celular corneal epitelial inmortalizada resultante (HuCl-22 / cdk4R / p53DD /TERT, o, abreviadamente, HCLE), se caracteriza por expresar el mismo repertorio genético de mucinas y queratina que produce su epitelio nativo.

2.1.1.1. Descongelación de las células

El proceso de descongelación se realizó de forma rápida sumergiendo el vial de células (guardado a -80°C) en un baño de agua a 37°C. Una vez descongelado, se trasvasó el contenido del vial a un falcon preparado con 10 ml de medio de cultivo dulbeco modificado (DMEM-F12) suplementado con 10% de FBS y 10 ng/ml de EGF. Posteriormente, las células se centrifugaron a 25°C, durante 5 minutos, a 1609.92 x g y se resuspendieron en medio *Keratinocyte Serum Free Medium* (K-SFM) suplementado con 0.4 mM de CaCl₂, 25 µg/ml de extracto de pituitaria bovina, 0.2 ng/ml de EGF y 1% de penicilina-estreptomicina, a la densidad celular requerida para su siembra en las correspondientes botellas (F-75), comprobando a continuación su refringencia y estado en el microscopio. Las células se mantuvieron en un incubador *Heracell* (Heraeus) con flujo controlado de 5% de CO₂, temperatura constante de 37°C y 95% de humedad.

2.1.1.2. Cultivo celular y subcultivos

La realización y manipulación de los ensayos con la línea celular comentada anteriormente se llevó a cabo en todo momento bajo condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar vertical (Heraeus), siendo todo el material esterilizado previamente en autoclave durante 20 minutos, a 121°C. Todas las soluciones se filtraron en la campana usando filtros estériles de 0.2 µM con ayuda de jeringas

estériles de 50 ml. Se comprobó diariamente el estado y la evolución de las células verificando la metabolización del medio de cultivo a través de la observación visual del color del medio en la botella F-75 (dotado de rojo fenol como indicador de pH), y controlando el estado de la monocapa celular mediante observación por microscopía (microscopio Zeiss Axiovert 200M equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal). En función de estos parámetros, el medio de cultivo se cambió habitualmente cada dos o tres días. Se llevaron a cabo subcultivos celulares, cuando el número de células por superficie de crecimiento era lo suficientemente elevado, o cuando las células alcanzaron la confluencia, estado en el que las células de los cultivos se habían multiplicado hasta ocupar toda la superficie útil del soporte sobre el cual crecían. Para realizar dichos subcultivos, se eliminó el medio de la botella donde están cultivadas las células, las cuales eran liberadas a continuación por tripsinización de la superficie de crecimiento (con tripsina al 0.05%). El cultivo celular se mantuvo durante 10 minutos a 37°C en la estufa de cultivos, controlándose el proceso de liberación de las células de la superficie de cultivo por observación al microscopio. Cuando las células se encontraban en suspensión, se añadió medio de cultivo completo DMEM/F12 conteniendo suero fetal bovino con el fin de inactivar la tripsina con el inhibidor de tripsina presente en dicho suero. De esta manera se evitó una exposición excesiva del cultivo a esta enzima, lo que podría provocar daños celulares. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 25°C, a 2191.23 x *g* (centrífuga Kubota 6.500) durante 5 minutos, y el sedimento se resuspendió en un volumen apropiado de medio de cultivo completo. Para poder determinar el número de células se empleó una cámara de Neubauer y el microscopio de contraste de fases, el cual también se utilizó para el seguimiento y observación de las células durante los días de cultivo. A continuación, las células se sembraron en medio K-SFM en nuevos frascos de cultivo para su propagación, o se prepararon, de forma adecuada, para los distintos tipos de ensayos.

2.1.1.3. Conservación de los cultivos celulares

Para la conservación de los cultivos, las células se tripsinizaron y centrifugaron, como se ha descrito previamente. Las células se resuspendieron en medio de congelación que contiene FBS al 10% (v/v) y DMSO al 10% (v/v) como agente criopreservante. La suspensión se transfirió a viales estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad para proceder a su congelación a -80°C. Para conseguir que la temperatura descendiera a una velocidad de 1°C/min, los viales se introdujeron en un recipiente de plástico con alcohol isopropílico (Nalgene) guardándose inmediatamente a -80°C.

2.1.2. Modelos animales

Todo el mantenimiento, procedimientos experimentales y sacrificio se llevó a cabo de acuerdo con la declaración para el uso de animales en investigación oftalmológica y de visión (*“ARVO, Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research”*) y según la normativas establecidas en la Unión Europea (Directivas 86/609/CEE y 2010/63/UE) y en la legislación Española (Ley 32/2007, RD 1201/2005 y RD 53/2013) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

2.1.2.1. Modelo de conejo albino de Nueva Zelanda

En nuestro estudio se utilizaron conejos blancos normotensos de Nueva Zelanda, con un peso comprendido entre 2.5 ± 0.5 kg, mantenidos en jaulas individuales con agua y comida *ad libitum*. Los animales se sometieron a ciclos de luz/oscuridad controlados de 12 horas/12 horas.

2.1.2.2. Modelos de ratón: C57BL/6 y DBA/2J

Se utilizaron para estudios *in vivo* dos modelos de ratones hembras adultas, C57BL/6J y DBA/2J, obtenidos del distribuidor de ratones europeo *Jackson Laboratories Mice* (*Charles Rivers Laboratories*).

El ratón DBA/2J es un modelo generado como resultado de mutaciones genéticas espontáneas en los genes *Gpnmb* y *Tyrp* (John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2007), y presenta patología glaucomatosa causada por la dispersión del pigmento del iris y la atrofia del estroma. Los ratones se emplazaron en dos armarios ventilados (Tecniplast) con ultrafiltración de entrada y salida a una temperatura de 24°C, con un fotoperíodo de 12h luz/12h oscuridad. Las jaulas eran de tipo II (área: 375 cm²; altura 140 mm) (UNO, Panlab) y se incluyeron cuatro animales por jaula. Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida.

2.2. Medida de los niveles de lisozima y lactoferrina en lágrima de conejo albino de Nueva Zelanda tras la aplicación tópica de Ap₄A

2.2.1. Tratamientos

2.2.1.1. Curso temporal: aplicación tópica de Ap₄A 100 µM en diferentes tiempos

Se aplicaron tópicamente 10 µl de Ap₄A (100 µM) en uno de los ojos de los animales (aplicando el mismo volumen en el ojo contralateral como control con NaCl estéril al 0.9%), y se obtuvieron muestras de lágrima para evaluar los niveles de lisozima y de lactoferrina a lo largo de 6 horas.

2.2.1.2. Aplicación tópica de Ap₄A a diferentes concentraciones

Se aplicaron tópicamente 10 µl de Ap₄A a diferentes concentraciones (10^{-11} a 10^{-3} M) en uno de los ojos de los animales, tomando las muestras del ojo contralateral como control (aplicando el mismo volumen de NaCl estéril al 0.9%).

2.2.1.3. Ensayos con antagonistas de receptores purinérgicos

Se instilaron antagonistas de los receptores P2 (PPADS, suramina y RB-2) en concentraciones de 100 µM (10 µl), 30 minutos antes de la aplicación de Ap₄A en uno de los ojos del animal. Transcurrido ese tiempo, se instiló ese mismo ojo con Ap₄A (10 µl, 100 µM), mientras que el ojo contralateral fue instilado con vehículo control (10 µl, NaCl estéril al 0.9%).

2.2.2. Medida de los niveles de lisozima en lágrima de conejo mediante difusión en agar tras la aplicación tópica de Ap₄A

Se utilizó el método de difusión en agar para medir los niveles de lisozima obtenidos tras la aplicación tópica de Ap₄A en la lágrima del conejo albino de Nueva Zelanda. Todas las mediciones de lisozima así como las curvas calibración se realizaron según los protocolos descritos previamente (van Bijsterveld, 1974) y (Mackie *et al.*, 1976). Con el uso de unas pinzas, se colocaron discos de papel Whatman nº1 de 5 mm de diámetro sobre la conjuntiva bulbar superior de los ojos de los animales, siendo retiradas cuando se empaparon de lágrima. A continuación se colocaron los discos en placas de Petri con medio de agar donde se cultivó la bacteria *Micrococcus lisodeikticus*, y se incubaron dichas placas a 37°C durante 24 horas. La cantidad de lisozima se obtuvo midiendo los halos de inhibición que se produjeron alrededor de los discos empapados en lágrima, tras la aplicación del tratamiento correspondiente con Ap₄A.

Las curvas de calibración de la lisozima y su cuantificación se realizaron con concentraciones conocidas de cloruro de lisozima obtenida en huevo de gallina, pesándose los discos antes y después de estar empapados por la lágrima de conejo con el fin de estimar el volumen equivalente de solución de lisozima a aplicar en los discos de papel de calibración. La diferencia de peso era el equivalente a 5 µl de solución con lisozima, por lo que se aplicó dicho volumen para estimar la curva estándar. Se aplicaron concentraciones de lisozima comprendidas entre 0.1 mg/ml y 12 mg/ml en los discos en un volumen final de 5 µl. Para medir el diámetro de los halos, se escanearon las placas de Petri y se analizaron mediante el programa informático Image J. Las imágenes escaneadas de los halos de inhibición se transformaron en imágenes de 8 bits en blanco y negro y se transformaron adicionalmente en una imagen binaria antes del cálculo correspondiente.

2.2.3. Medida de los niveles de lactoferrina en lágrima de conejo mediante ELISA tras la aplicación tópica de Ap₄A

Se recogieron 100 µl de lágrima del saco conjuntival inferior del ojo de cada conejo, mediante tubos capilares, obteniendo muestras del animal control y tratado. Una vez recogidas las muestras, se centrifugaron a 4°C y a 825.08 x g durante 20 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a -20°C. Se procedió a medir los niveles de lactoferrina presentes en la lágrima mediante un ensayo de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) con el kit comercial *Rabbit Lactoferrin ELISA kit*, de *Emelca Bioscience*. Para ello, se añadieron en primer lugar 50 µl del estándar (lactoferrina) o de las muestras correspondientes a los pocillos que tienen anclado un anticuerpo monoclonal contra la lactoferrina y a continuación se adicionaron 100 µl de anticuerpo anti-lactoferrina conjugado con HRP. Se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente se lavó la placa cuatro veces. Por último se añadieron 100 µl del

sustrato cromogénico TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina) y se incubó la placa a 37°C en oscuridad durante 15 minutos, transcurridos los cuales se añadieron 50 µl de la solución de parada del kit. Las densidades ópticas se miden a 450 nm con el lector de placas (PowerWave XS2, Biotek). La concentración de las muestras se calculó por interpolación en la recta patrón del estándar.

2.3. Tratamientos de las células de epitelio corneal con distintos agentes

En los estudios de resistencia eléctrica transepitelial las células HCLE se expusieron durante 5 minutos al dinucleótido Ap_4A así como a los dinucleósidos polifosfato Ap_3A y Ap_5A . Asimismo se evaluaron los mononucleótidos ATP, UTP, ADP y UDP. Todos los compuestos se testaron a una concentración de 100 µM. Se eligió el tiempo de incubación de 5 minutos, ya que es el tiempo máximo que cualquier compuesto puede permanecer en la superficie ocular antes de que sea totalmente drenado por el punto lagrimal (Lang, 1995). Transcurrido este tiempo, se retiraron los correspondientes nucleótidos y se añadió medio K-SFM procediendo a la medida de la resistencia eléctrica transepitelial a lo largo del tiempo para evaluar el efecto de los nucleótidos sobre la función de barrera.

Idénticas condiciones experimentales, cinco minutos de exposición y concentración 100 µM de Ap_4A o de UTP se emplearon en los ensayos de inmunodetección de las células, en los que tras la exposición de 5 minutos al nucleótido correspondiente, las células se recogieron a distintos tiempos (1 hora, 2 horas, 6 horas y 24 horas). Asimismo se llevó a cabo una curva dosis-respuesta con el dinucleótido Ap_4A evaluándose su efecto en el rango de concentraciones de 10 nM a 300 µM transcurridas 2 horas desde la exposición de 5 minutos al agente.

En los ensayos de inhibición de la ruta de las ERK1/2, las células HCLE se pre-incubaron durante 30 minutos con el inhibidor U0126 (100 μ M) para proceder a continuación, en presencia de dicho inhibidor, a realizar el tratamiento de cinco minutos con Ap₄A (100 μ M) como se ha descrito previamente.

2.4. Ensayos de silenciamiento del receptor P2Y₂ mediante siRNA

Se transfectó una mezcla de RNAs pequeños de interferencia (*Small o short interfering RNA*, siRNAs) con el fin de inducir el silenciamiento del receptor P2Y₂, utilizándose una mezcla de dos secuencias individuales de siRNA (*Thermo Scientific*), (5'-CAACAUGGCCUACAAGGUUUU-3') y (5'-GAACUGACAUGCAGAGGAUUU-3'), descritas previamente (Boucher *et al.*, 2010). La transfección se llevó a cabo cultivando las células HCLE en placas de seis pocillos a un 50% de confluencia, y siguiendo el protocolo descrito por el kit Polyplus Transfection. Se descongelaron las alícuotas de cada secuencia de siRNA (-80°C), y se atemperaron los reactivos de transfección (el buffer *jetPRIMETM* y el agente de transfección *jetPRIMETM*). A continuación, se diluyeron las cantidades correspondientes de cada siRNA (los cuales se prepararon a concentraciones finales de 50 nM y 100 nM) en 200 μ l de buffer *jetPRIMETM*, mezclándose bien mediante pipeteo. Seguidamente, se añadieron 4 μ l del agente de transfección *jetPRIMETM*, y se agitó en el vórtex durante 10 segundos, incubándose después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió la mezcla de transfección a las células y se incubaron durante 4 h a 37°C. A continuación, el medio de transfección se reemplazó por medio de crecimiento celular y las células se recogieron para analizar la expresión proteica del receptor P2Y₂ transcurridas 24 y 48 horas.

2.5. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), es un indicador de la confluencia e integridad celular, así como de la formación de uniones estrechas entre las células.

Tras el tratamiento con los correspondientes nucleótidos se evaluó la resistencia eléctrica transepitelial de las células HCLE crecidas en una placa de cultivo tipo *transwell* de 12 pocillos a distintos tiempos: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 24 h. Con este fin se utilizó el multímetro *Evom² Epithelial Voltohmmeter* (World Precision Instruments).

Antes de cada medida, el *Evom²* se puso a cero de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un inserto del *transwell* se dejó en blanco, como control para determinar la resistencia intrínseca del filtro, el cual se restó a todas las lecturas. Entre las distintas medidas el electrodo se lavó con medio sin suero. Los experimentos se realizaron por triplicado y la resistencia eléctrica transepitelial ($\text{Ohm} \times \text{cm}^2$) se calculó multiplicando la resistencia eléctrica medida por el área del filtro (1.12 cm^2).

2.6. Ensayos de inmunodetección de proteínas en membrana mediante Western Blot

Se analizaron los niveles de expresión de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-7 (proteínas constituyentes de las TJ), así como de pERK1/2 y P2Y₂ mediante ensayos de inmunotransferencia o Western Blot en extractos de células HCLE. Del mismo modo, en otros ensayos de Western Blot se analizaron los niveles proteicos de ZO-1 en la córnea de ratones control (C57BL/6J) y de ratones glaucomatosos (DBA/2J), comparando dichos niveles a los tres y quince meses de edad de dichos animales.

Previamente a la realización de dicha técnica, en ambos casos se lisaron las muestras, se cuantificaron las proteínas totales, y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Se especificarán en cada caso las condiciones que se utilizaron, tanto para los ensayos con extractos celulares (extractos de células HCLE), como para los realizados con extractos de córneas de ratón (C57BL/6J y DBA/2J).

2.6.1. Lisado celular

En primer lugar se realizaron varios lavados de las células con PBS 1X. La recogida de células se realizó por raspado de los cultivos empleando el tampón RIPA (*Radio-immunoprecipitation Assay*, tampón de ensayo de Radio-Inmunoprecipitación), compuesto por NaCl (150 mM), Tris HCL pH 7.6 (25 mM), Nonidet P-40 (1%), desoxicolato de sodio (1%) y dodecil sulfato sódico (SDS, 0.1%), suplementando con inhibidores de proteasas y fosfatasas (*Halt Protease inhibitor cocktail plus*, de *Thermo Scientific*). A continuación las células se sometieron a agitación durante 10 segundos con un *Pellet Pestle* (Thermo Scientific) para asegurar la lisis celular, después se centrifugaron a 4°C y 20627.1 x g durante 15 minutos con el fin de eliminar el material celular no solubilizado. El sedimento se descartó y el sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización.

Para los experimentos de Western Blot realizados con las córneas de los ratones control (C57BL/6J) y ratones glaucomatosos (DBA/2J), se descongelaron las córneas y se homogeneizaron en tampón de extracción RIPA suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas, (PMSF (1 mM), Leupeptina (10 µg/ml)), Pepstatina (5 µg/ml), Aprotinina (10 µg/ml), NaF (1 mM), Na₃VO₄ (2 mM) a una relación 1:5 (p/v) a 4°C, en hielo. Las córneas se trocearon manualmente con el uso de unas tijeras durante aproximadamente 45 minutos cada muestra, y seguidamente se hicieron pasar los homogeneizados 30 veces a través de una pipeta, dejándose 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugándose a 4°C, durante 15 minutos.

Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes, se hicieron alícuotas de 10 μ l y se guardaron a -20°C.

2.6.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteína presente en los extractos celulares se cuantificó mediante un kit comercial (*Pierce BCA Protein Assay kit*). Este kit permite valorar cantidades de proteína comprendidas entre 25 y 2000 μ g/ml. En este ensayo las muestras de proteína cuya concentración se pretendía valorar se diluyeron (1:10) y se aplicaron por triplicado a una placa de 96 pocillos. Asimismo se pipetearon en la placa muestras de concentración conocida de albúmina de suero bovino, que se emplearon para la generación de una recta de calibrado. A continuación se añadió el compuesto WR proporcionado con el kit, el cual contiene iones de cobre que forman complejos coloreados con las proteínas a valorar. Transcurridos 30 minutos de incubación a 37°C se midió la absorbancia de los compuestos coloreados obtenidos en un lector de placas (Power Wave XS2, Biotek) a una longitud de onda de 562 nm.

Para cuantificar las proteínas totales presentes en las córneas de ratón, se empleó el método descrito por Bradford (Bradford, 1976) utilizando un kit que permite valorar cantidades de proteína comprendidas entre 0 y 25 μ g/ml. Se añadió a las muestras, previamente diluidas (1:1000), 1 ml de reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, preparándose triplicados por cada muestra. A continuación se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas (Power Wave XS2, Biotek). Para la curva de calibración se usó albúmina de suero bovino.

2.6.3. Preparación de las muestras

Las muestras de células se descongelaron y se centrifugaron a 4°C y 9167.6 x g durante 5 minutos. Una vez determinadas las concentraciones de proteínas

presentes en cada una de las muestras se calculó el volumen de muestra necesario para cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis: 40 µg para los Western Blot de las proteínas ZO-1, ocludina, P2Y₂, pERK1/2, GAPDH y 60 µg para los Western Blot de la proteína claudina-7.

Las muestras se prepararon disolviéndolas en tampón Laemmli 3X (Tris 195 mM, pH 6.8, SDS al 9% (p/v), glicerol al 30% (v/v), azul de bromofenol al 0.02% (p/v) y β-mercaptoetanol al 15% (v/v)). Finalmente, se calentaron las muestras a 95°C durante 5 minutos para favorecer su desnaturalización, se dejaron enfriar y se centrifugaron unos segundos antes de ser cargadas en el gel de electroforesis.

Por otro lado, se descongelaron las muestras de proteínas obtenidas tras lisar las córneas de los ratones y se preparó la cantidad de proteína total de cada una de las muestras analizadas previamente por Bradford (40 µg para ZO-1), diluyéndolas en relación 1:1 con tampón Laemmli 2X (Tris 125 mM, pH 6.8; EDTA 15 mM, SDS al 4% (p/v), glicerol al 20% (v/v), azul de bromofenol al 0.004% (p/v) y β-mercaptoetanol al 10% (v/v)).

2.6.4. Separación electroforética de proteínas (SDS-PAGE)

Una vez preparadas las muestras, se separaron en función de su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en un sistema discontinuo.

Preparación de los geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida para el desarrollo de la electroforesis tenían grosores de 1.5 mm y se prepararon partiendo de una disolución de acrilamida al 30% (p/v) y N, N'-metilen-bisacrilamida al 0.8% (p/v) en agua ultrapura. La polimerización

de los geles se inició por adición de persulfato amónico y TEMED. La mezcla se agitó y se depositó mediante pipetas sobre el soporte de polimerización. Una vez polimerizado el gel separador se procedió a la eliminación completa del agua por inversión de la placa. A continuación, se añadió sobre el gel separador el gel concentrante constituido por una disolución que contiene acrilamida al 4% (p/v). De nuevo, la polimerización se desencadenó por adición de persulfato amónico y TEMED. Seguidamente, se añadió un peine al gel concentrador, originando de este modo los pocillos de aplicación.

Desarrollo electroforético

La separación de las proteínas se realizó a temperatura ambiente utilizando un sistema Mini-Protean 3, de Bio-Rad, empleándose un tampón de electroforesis 1X (Tris 25 mM, pH 8.4, glicina al 0.14% (p/v) y SDS al 0.1% (p/v)). Se aplicó una intensidad de corriente constante de 25 mA/gel durante aproximadamente 45 minutos-1 hora, hasta que el frente electroforético alcanzó el final del gel separador, momento en que se paró la electroforesis.

2.6.5. Transferencia e inmunodetección (Western Blot)

Transferencia y bloqueo

La transferencia electroforética se realizó básicamente según el procedimiento descrito por Towbin y colaboradores (Towbin *et al.*, 1979). Tras el desarrollo de la electroforesis en las condiciones anteriormente descritas, los geles, así como las membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham) y los papeles (Bio-Rad), se equilibraron durante 15 minutos en tampón de transferencia (Tris 48 mM, pH 9.5, glicina 39 mM, SDS 0.0375% (p/v) y metanol al 20% (v/v)). El desarrollo de la misma se llevó a cabo utilizando un equipo de transferencia (Bio-Rad) *semi-dry*, aplicándose

un voltaje constante de 22 V durante 1 hora hasta conseguir la transferencia total de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa (Figura 13).

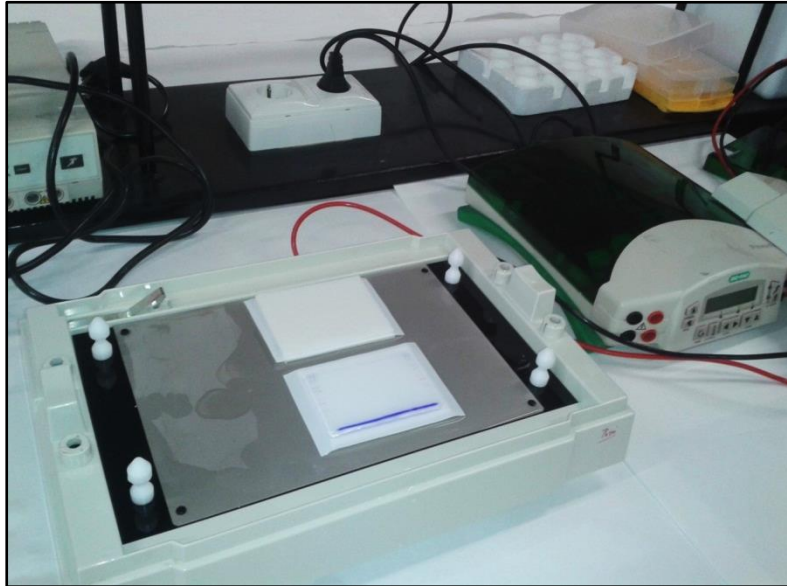


Figura 13. Sistema de transferencia *semi-dry*. Membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas.

Finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas del gel de electroforesis se saturó por incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con PBS 1X que contenía leche en polvo al 5% (p/v).

Las membranas con las proteínas procedentes de las córneas lisadas de ratón (C57BL/6 y DBA/2J), se lavaron con TBS 1X-Tween 20 al 0.1% y se bloquearon durante 1 hora en esta misma solución con leche en polvo al 5%, a temperatura ambiente.

Incubación con anticuerpos primarios y secundarios

El paso siguiente consistió en la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios (ver anticuerpos utilizados y su dilución en la Tabla 8). En los ensayos realizados con extractos celulares, los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS 1X-Tween 20 al 0.05% con leche en polvo al 2% durante toda la noche, a 4°C y

en agitación. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS 1X-Tween 20 al 0.05%. La incubación con el correspondiente anticuerpo secundario, el cual estaba marcado con peroxidasa (ver anticuerpos utilizados en la Tabla 8) y diluido 1:10.000 en PBS 1X-Tween 20 al 0.05% con leche en polvo al 0.25%, se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizarse lavados en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo se procedió al revelado de la membrana.

En los experimentos realizados con extractos proteicos de córneas de ratón (C57BL/6 y DBA/2J), se incubaron las membranas con el anticuerpo primario anti-ZO-1 de conejo (1:125) diluido en leche en polvo (al 5%) disuelta en el tampón TBS 1X-Tween 20 al 0.1% durante toda la noche. Al día siguiente, se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en TBS 1X-Tween 20 al 0.1% con leche libre de grasas al 0.25%, durante 1 hora y a temperatura ambiente. Después de la incubación con cada anticuerpo se realizaron cuatro lavados con TBS 1X-Tween 20 al 0.1%.

Revelado

El revelado se realizó utilizando el kit comercial de ECL (*Enhanced ChemiLuminiscence, Amersham*) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H_2O_2 catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. La exposición de una película fotográfica (*Hyperfilm-ECL, Amersham*) a la membrana permitió la detección de las bandas proteicas reconocidas por el anticuerpo tras el revelado de la película.

Reprobing

Adicionalmente, tras el análisis por inmunotransferencia de la proteína a estudiar, se reutilizaron las membranas de nitrocelulosa empleando anticuerpos frente a la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, proteína que permanece invariable en el modelo de estudio durante los diferentes tratamientos que se llevan a cabo) o frente a ERK2 (para las membranas previamente incubadas con p-ERK). Con ello, se pudieron obtener valores de referencia que permitieron la normalización de las intensidades de las bandas de las proteínas a analizar. La reutilización de las membranas se llevó a cabo sumergiendo las membranas de nitrocelulosa en tampón Tris 62.5 mM, pH 6.7, SDS 2% (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM durante 30 minutos a 55°C. Tras la retirada del tampón y posteriores lavados de la membrana con PBS 1X-Tween 20 al 0.05% (o TBS 1X-Tween 20 al 0.1%) a lo largo de 30 minutos, se continuó con el protocolo de detección con anticuerpos a partir de la saturación con leche libre de grasas.

Densitometrado de las películas

Las películas se escanearon y se realizó un análisis densitométrico utilizando el software Kodak Gel Logic 200 *Molecular Imaging Software* (Kodak). Los datos se corrigieron respecto a la intensidad de la banda correspondiente al GAPDH para cada condición y se normalizaron respecto al valor control expresándose en porcentaje. En el caso de las películas para estudiar la fosforilación de la ruta de las ERKs, los datos se corrigieron respecto a las bandas de la proteína ERK2.

2.7. Ensayos de inmunocitoquímica

Tras el correspondiente tratamiento, las células HCLE se lavaron con PBS 1X y se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos. Después de los lavados, se llevó a cabo la permeabilización de las células con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% durante 30 minutos y a continuación se incubaron con tampón de bloqueo (PBS 1X-Triton X 100 al 0.1% con suero de burro (NDS) al 10%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron las células con el anticuerpo primario de conejo anti-ZO-1 (1:125) diluido en PBS 1X-Triton X 100 al 0.1% durante toda la noche. Al día siguiente, se incubaron las células con el anticuerpo secundario conjugado con FITC diluido en PBS 1X-Triton X 100 al 0.1% durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X y las células se incubaron a 4°C durante 10 minutos con ioduro de propidio (1:500) en oscuridad. Todas las preparaciones se evaluaron por microscopia confocal (microscopio Zeiss Axiovert 200M, con el módulo confocal LSM 5 Pascal).

2.8. Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular se realizaron ensayos de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983; Denizot *et al.*, 1986). Las células HCLE crecidas en placas de 24 pocillos se expusieron a Ap₄A (100 µM) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadieron 400 µl de MTT 0.5 mg/ml de concentración final, incubándose las células en el incubador de cultivos a 37°C durante 2 h. Tras la incubación, se retiró el sobrenadante y se disolvieron los cristales de formazán en 400 µl de DMSO. Se trasvasaron 250 µl a

una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de placas (PowerWave XS2, Biotek). Se incluyó siempre un blanco de medida y además se restó para cada pocillo el valor de la absorbancia intrínseca de la placa de plástico sin nada, medida a 690 nm. Los valores numéricos obtenidos de los experimentos de MTT se expresan como porcentaje de la viabilidad celular con respecto a las células control (no tratadas). Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.9. Ensayos de espectrofotometría para evaluar el paso de compuestos de distinto peso molecular a través del epitelio corneal

Con el fin de tener una aproximación acerca del tamaño de las partículas que pueden atravesar la barrera epitelial de la córnea a través de la vía paracelular, se llevaron a cabo experimentos espectrofotométricos, en los cuales se utilizaron colorantes con diferentes pesos moleculares (hematoxilina, cuyo peso molecular es 302.28 g/mol; azul de bromofenol, con peso molecular de 669.96 g/mol y azul de Evans, de 960.81 g/mol) a una concentración cada uno de ellos de 1 mM, valorando mediante medidas de absorbancia la penetración de los mismos a través de células HCLE, después del correspondiente tratamiento con Ap_4A .

Para ello se cultivaron células en filtros *transwell* de policarbonato (de 12 mm de diámetro, insertos en placas de doce pocillos (Corning), hasta alcanzar el 100% de confluencia. Se aplicó una concentración 100 μM de Ap_4A durante 5 minutos, y, tras la retirada del dinucleótido, se añadió medio K-SFM, incubándose las células durante 2 h. Una vez transcurrido este tiempo, y durante otras 2 h, se llevó a cabo el estudio espectrofotométrico para estimar la facilidad de penetración de dichos compuestos a través de las células en cultivo. Los experimentos se realizaron colocando el correspondiente colorante (a concentración 1 mM cada uno) en el medio de cultivo y

recogiendo en la parte inferior del *transwell* muestras de cada uno de los colorantes, para ser medidas a continuación espectrofotométricamente en el lector de placas (Power Wave XS2, BioTek). Cada uno de los experimentos se realizó recogiendo una alícuota de 100 μ l de cada condición, a intervalos de 5 minutos durante un tiempo máximo de 2 h. Las medidas se realizaron a distintas longitudes de onda en función de cada compuesto, así hematoxilina y azul de bromofenol se midieron a 590 nm, y azul Evans a 605 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

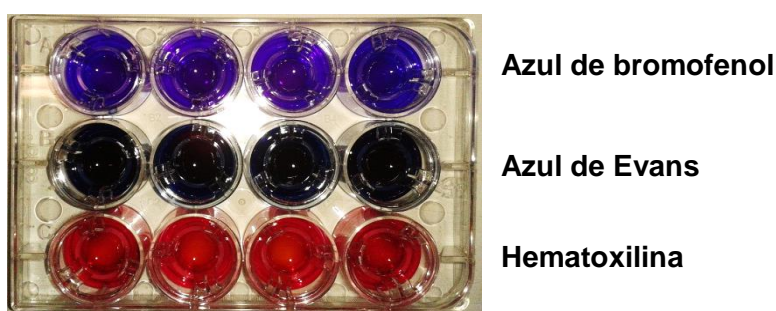


Figura 14. Ensayos de espectrofotometría para determinar los tiempos de equilibrio de las concentraciones de tres colorantes con diferentes pesos moleculares. Filtros *transwell* con los colorantes, en ausencia de células HCLE.

2.10. Tratamientos *in vivo* con distintos agentes

Aplicación de Ap_4A y 5-MCA-NAT

Se utilizaron conejos albinos de Nueva Zelanda para realizar experimentos de presión intraocular (PIO) con el fin de evaluar el efecto de 1 μ M del análogo de melatonina 5-MCA-NAT (formulado en solución salina isotónica que contiene 1% de DMSO) aplicado de manera individual, simultáneamente con Ap_4A (10 μ M) (“ Ap_4A + 5-MCA-NAT”) y 2 h después del pretratamiento con Ap_4A (10 μ M) (“ Ap_4A /5-MCA-NAT”). Del mismo modo se procedió a evaluar la entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de los conejos tras su instilación en uno de los ojos de los animales, mediante experimentos de cromatografía de alta resolución (HPLC). Los tratamientos para estos

experimentos se realizaron de la misma manera que la descrita anteriormente, variando únicamente la concentración del compuesto 5-MCA-NAT (10 mM).

Asimismo, se evaluó el efecto de nucleótido UTP (10 μ M) en la entrada de 5-MCA-NAT a través de la córnea de conejos empleando similares condiciones experimentales: 5-MCA-NAT aplicado de manera individual, aplicado simultáneamente con UTP (10 μ M) ("UTP + 5-MCA-NAT") y 2 h después del pre-tratamiento con UTP (10 μ M) ("UTP/5-MCA-NAT").

En todos los casos, el volumen que se instiló fue de 10 μ l, tanto para Ap_4A , UTP y 5-MCA-NAT (instilados en uno de los ojos de cada animal), como para el vehículo control (NaCl estéril al 0.9% en el ojo contralateral de cada animal), y se aplicó una dosis por conejo/día para este tipo de experimentos.

Ensayos con antagonistas de receptores purinérgicos

Los antagonistas PPADS, suramina y RB-2 se emplearon para investigar la implicación de los receptores purinérgicos. Estos compuestos se aplicaron a una concentración de 100 μ M, 30 minutos antes de la aplicación de Ap_4A (el cual se preparó a una dosis máxima de 10 μ M) instilando 10 μ l de cada compuesto en uno de los ojos del animal. El ojo contralateral recibió el mismo volumen de vehículo (NaCl estéril al 0.9%), y se tomó como el valor control.

Aplicación de Ap₄A y su combinación con agentes adrenérgicos

Se realizaron experimentos tanto para medir PIO como para analizar la entrada en el humor acuoso en conejos albinos de Nueva Zelanda de los siguientes compuestos: brimonidina (agonista de los receptores α 2-adrenérgicos) (20 μ l, 2 mg/ml) y timolol (antagonista de los receptores β -adrenérgicos) (20 μ l, 5 mg/ml) aplicados solos, combinados simultáneamente con Ap₄A (10 μ l, 10 μ M) ("Ap₄A + agente adrenérgico") o 2 h después del pre-tratamiento con Ap₄A ("Ap₄A/agente adrenérgico") a través de las córneas de conejos. Uno de los ojos de cada animal se empleó para aplicar los tratamientos, y el ojo contralateral se utilizó como control, recibiendo el mismo volumen de vehículo que el ojo tratado (10 μ l de NaCl estéril al 0.9%).

2.11. Ensayos de silenciamiento del receptor P2Y₂ in vivo mediante siRNA

Para lograr el silenciamiento del receptor P2Y₂ de conejo se empleó un siRNA (véase la Tabla 11) cuya secuencia de nucleótidos ha sido previamente descrita por nuestro laboratorio (Crooke *et al.*, 2009; Martin-Gil *et al.*, 2012). Se aplicaron 10 nmol de siRNA (resuspendidos en 40 μ l agua-RNasa libre de DNasas) en un solo ojo de cada conejo durante cuatro días consecutivos. Los ojos contralaterales se utilizaron como controles y se trataron con NaCl estéril al 0.9% o mediante un siRNA *scramble* a la misma concentración que la descrita anteriormente. Una hora después de la aplicación de siRNA, se realizó la instilación de Ap₄A (10 μ M) con el fin de evitar posibles interferencias entre ambos compuestos y se añadió el análogo de melatonina 5-MCA-NAT 2 h después de la aplicación de Ap₄A.

Tabla 11. Secuencia de siRNA para estudios *in vivo*.

Diana	Secuencia de siRNA
P2Y ₂	Sense 5'-CCU GUA CUG CAG CAU CCU Ctt-3'
	Antisense 5'-GAG GAU GCU GCA GUA CAG Gtt-3'

2.12. Procedimiento de extracción del humor acuoso

Para la extracción de humor acuoso de los conejos, se pesaron en primer lugar los animales y se anestesiaron mediante una inyección subcutánea con una mezcla de ketamina (*Ketamidol*®: 15 mg/kg) y medetomidina (*Domtor*®: 0.25 mg/kg). Posteriormente, tras la aplicación subcutánea de atipamezol (*Antisedan*®: 0.25 mg/kg) se recuperaron los animales aproximadamente 1 hora después de la inducción de la anestesia. El humor acuoso se aspiró utilizando una jeringa de calibre 27 G extrayéndose aproximadamente unos 100 µl de humor acuoso de cada ojo por animal, procesándose las muestras a continuación. Para ello, se mantuvieron durante 2 minutos a 98°C, y se centrifugaron a 15.871 x *g* para eliminar las proteínas como paso previo al análisis por HPLC.

Para llevar a cabo la extracción del humor acuoso en los ratones se pesaron en primer lugar los animales (tanto los controles, C57BL/6, como los que presentan patología glaucomatosa, DBA/2J), llevándose a cabo a continuación el proceso de anestesia general con una mezcla de ketamina (*Ketamidol*®: 95 mg/kg) e hidrocloreuro de xylacina (*Rompun*®: 5 mg/kg) mediante una inyección intraperitoneal. Seguidamente, se inmovilizó el globo ocular de cada uno de los animales utilizando unas pinzas curvas y fórceps y se extrajo el humor acuoso con el uso de una jeringa de calibre 30G. Todo el procedimiento de extracción del humor acuoso de los animales se llevó a cabo mediante una lupa stereo (Zeiss).

Aproximadamente se extrajeron 2 μ l de humor acuoso de cada ojo de cada ratón, los cuales se diluyeron con agua ultrapura hasta un volumen final de 10 μ l. A continuación, se procesaron las muestras de la misma manera que la descrita en el caso de la extracción de humor acuoso de conejos.

2.12.1. Cuantificación de la presencia de compuestos en el humor acuoso mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para analizar la presencia en el humor acuoso de los agentes que se han descrito anteriormente, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión, formado por una bomba isocrática (modelo 1515) de HPLC, un detector doble de absorbancia (modelo 2487) y un inyector manual de Rheodyne®, todos ellos gestionados por el software Breeze de Waters. El análisis se realizó en condiciones de cromatografía en fase reversa, se equilibró el sistema cromatográfico, y se seleccionaron, para cada experimento, una fase móvil, un flujo, y un eluyente monitorizado a una longitud de onda adecuada. La columna que se utilizó en todos los experimentos fue una NovaPak C-18 (de 15 cm de longitud y 0.4 cm de diámetro), de Waters. La fase móvil se desgasificó previamente a su utilización mediante un sonicador de baño durante un tiempo de 15 a 20 minutos.

En todos los casos se realizaron inyecciones de 10 μ l, tanto de muestras como de soluciones estándar (ATP 100 μ M, Ap₄A 100 μ M, 5-MCA-NAT 100 μ M). Para la extracción de humor acuoso de ratones C57BL/6 y DBA/2J se realizaron inyecciones que consistían en una mezcla de 5 μ l de ATP 100 μ M y 5 μ l de Ap₄A 100 μ M. La solución madre de estos estándares se preparó en agua ultrapura. Las muestras de los humores acuosos y sus correspondientes picos se transformaron en

concentraciones mediante la comparación con controles estándar externos con nucleótidos de concentración conocida, todo ello gestionado por el software Breeze.

A continuación, se resumen las condiciones finales que se emplearon, según el modelo animal utilizado y el compuesto a analizar (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones experimentales para la cuantificación de la entrada de compuestos en el humor acuoso mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Modelo animal	Compuestos	Fase móvil	Flujo	λ de detección
Conejos albinos de Nueva Zelanda	Ap ₄ A y 5-MCA-NAT	40% de metanol y 60% de agua ultrapura	0.8 ml/min	244 nm
	Brimonidina	0.1 mM KH ₂ PO ₄ y 10% de acetonitrilo (pH = 7.5)	0.8 ml/min	248 nm
	Timolol	40% de metanol con 60% de agua ultrapura	1.0 ml/min	294 nm
Ratones (C57BL/6J y DBA/2J)	Ap ₄ A y ATP	10 mM KH ₂ PO ₄ , 2mM de tetrabutilamonio, y 15% - 20% de acetonitrilo (pH = 7.5)	2 ml/min	260 nm

2.13. Medidas de presión intraocular

La presión intraocular se midió en conejos albinos normotensos de Nueva Zelanda por medio de dos tonómetros: por un lado, el tonómetro de contacto TonoPen® XL, es el más apropiado para la medición de la presión intraocular dentro del rango de 3 a 30 mm Hg en conejos (Abrams *et al.*, 1996). Dado que la aplicación del tonómetro puede producir molestias en los conejos, se aplicaron 10 μ l de un anestésico tópico (Colicursí doble Anestésico, 0.1 mg/ml de tetracaína más 0.4 mg/ml en oxibuprocaina 0.9% de solución salina, diluyéndose en una proporción 1:3 en 0.9% de solución salina) sobre la córnea antes de cada medida de la presión intraocular (Pintor *et al.*, 2001). El tonómetro de contacto Tonopen®XL se utiliza para medir la PIO en humanos, por tanto fue necesaria la utilización de una recta de calibrado (mostrada

en la Figura 15) para el procesamiento de los datos, validando su uso en el conejo albino de Nueva Zelanda. Con el objetivo de obtener el valor real de cada medida, se aplicó el factor de corrección indicado a continuación a los valores de PIO obtenidos directamente con Tonopen XL: Valor PIO ojo conejo = (Valor PIO Tonopen XL x 1.65) + 0.14.

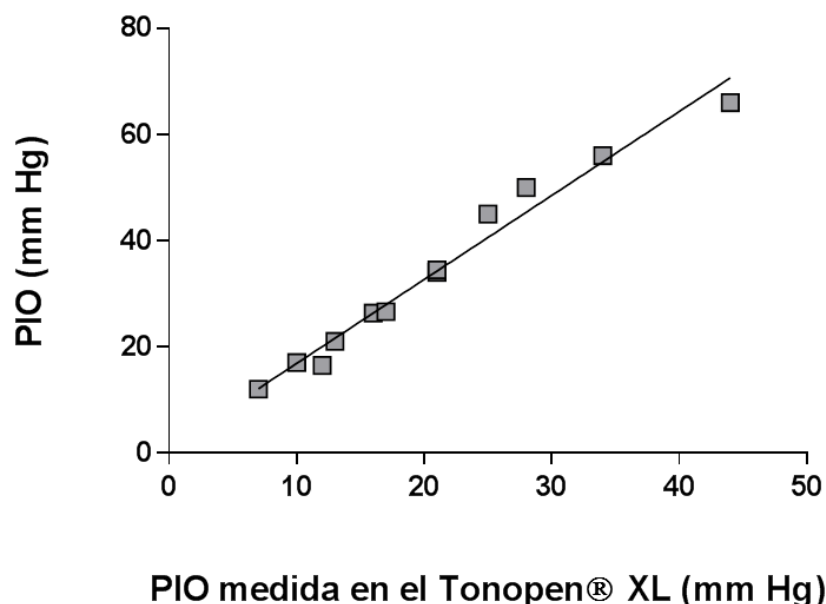


Figura 15. Recta de calibrado de Tonopen® XL (de uso para humanos). Representación de la PIO medida en el conejo con Tonopen® XL y la PIO equivalente a la que corresponde cada medida, teniendo en cuenta las diferencias existentes entre las dos especies.

Para los ensayos de medición de PIO en los que se instilaron brimonidina y timolol se utilizó el tonómetro Tonovet, cuyo uso no necesita anestesia, ni realizar la calibración debido a su diseño para uso animal. En todos los casos se tomaron dos medidas de la PIO basal 30 minutos antes de la aplicación de los compuestos, midiéndose la presión intraocular 30 minutos después de la instilación y cada hora durante un tiempo máximo de 8 horas para estudiar el efecto producido sobre la PIO.

Para medir la PIO en las dos cepas de ratón utilizadas (C57BL/6 y DBA/2J), se realizaron las medidas utilizando un tonómetro de rebote (Tonolab, de Tiolat, OY) en los animales previamente anestesiados con una mezcla de ketamina (*Ketamidol*®: 95

mg/kg) e hidrocloreuro de xylacina (*Rompun*®: 5 mg/kg) (Dantias *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Dicho tonómetro se situó en una posición fija y el sensor se alineó con el eje óptico del ojo a una distancia comprendida, aproximadamente, entre 1-4 mm. Inmediatamente después de anestesiarse a los ratones se procedió a medir la PIO en ambos ojos de cada animal (Ding *et al.*, 2011) a las edades de tres, nueve y quince meses, realizando las medidas siempre a la misma hora para evitar fluctuaciones debido al ritmo circadiano (Aihara *et al.*, 2003; Drouyer *et al.*, 2008). Con el fin de minimizar el error en las medidas, cada valor de PIO corresponde a la media de tres medidas que a su vez se obtuvieron tras seis lecturas automáticas por el tonómetro.

2.14. Evaluación de la salud ocular en el conejo albino de Nueva Zelanda mediante lámpara de hendidura y biomicroscopio especular

Con el fin de comprobar si la aplicación tópica de Ap₄A (10 µl, 10 µM y 100 µM), 5-MCA-NAT (10 µl, 10 µM y 100 µM) así como de los agentes adrenérgicos tartrato de brimonidina y timolol maleato (20 µl de ambos compuestos, a concentraciones de 2 mg/ml y 5 mg/ml de brimonidina o timolol, respectivamente) presentaron algún efecto no deseable *in vivo*, la evaluación del estado de salud ocular general, y la tolerancia de la superficie ocular se llevó a cabo mediante la observación de la superficie ocular a través de una lámpara de hendidura (Topcon SL-8Z) y del biomicroscopio especular (SP 2000 P) antes y después de la aplicación tópica de dichos compuestos. La observación mediante lámpara de hendidura se realizó utilizando técnicas de iluminación difusa (para valorar la presencia de alteraciones de salud ocular general), iluminación directa (en las que el área iluminada y el área enfocada coinciden en el punto de observación, permitiendo valorar la profundidad de cualquier condición situada en el interior de la córnea así como la evaluación de la película lagrimal, endotelio corneal y cristalino), y retroiluminación (técnica en la que la

luz viene reflejada del iris o de la retina, utilizada para la iluminación de cualquier condición en la córnea o el cristalino desde atrás). Para examinar la tolerabilidad ocular, uno ojo de cada conejo recibió solución salina al 0.9% como vehículo control, y el otro ojo fue instilado con los compuestos mencionados anteriormente.

2.15. Inmunohistoquímica: extracciones de córneas montadas en plano y secciones transversales

2.15.1. Extracciones de córnea montadas en plano

Se utilizaron los dos modelos animales descritos anteriormente para la realización de experimentos de inmunohistoquímica, mediante el uso de inmunotinción con extracciones de córneas que se montaron en plano, una vez eutanasiados y enucleados los animales.

En el caso de los conejos albinos de Nueva Zelanda, se aplicó tópicamente el dinucleótido Ap_4A (10 μ l, 10 μ M) en uno de los ojos de los conejos y en el ojo contralateral se instiló tratamiento control (10 μ l de NaCl estéril al 0.9%). Los animales utilizados para este tipo de experimentos se eutanasiaron por sobredosis con propofol (*Lipuro*®: 10 mg/ml) (a las 2 h y a las 24 h de la aplicación de Ap_4A), mediante una inyección intravenosa. A continuación, se enuclearon los ojos y se sumergieron las córneas inmediatamente en una solución de fijación con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M a pH 7.4. En el siguiente paso se lavaron las córneas en solución salina tamponada con fosfato durante 1 hora, permeabilizándose después con PBS 1X-Triton X-100 al 2%. Una vez realizados estos pasos, se bloquearon las córneas con PBS 1X-Triton X-100 al 2% con suero normal de cabra al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se incubaron con el anticuerpo primario anti-ZO-1 (1:125) diluido en PBS 1X-Triton X-100 al 0.2%, con suero normal de cabra al 2%, toda la

noche. Después de realizarse tres lavados con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (1:200) a temperatura ambiente diluido en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% durante 2 h. Se lavó el tejido posteriormente tres veces con PBS 1X y se incubó durante 20 minutos en oscuridad con una disolución de ioduro de propidio (1:500) en PBS 1X a 4°C para visualizar los núcleos. Se realizaron cuatro cortes radiales utilizando como material quirúrgico tijeras estériles curvas de disección, con microscopio estéreo y fórceps de 0.8 mm. Posteriormente, se montaron las preparaciones con las córneas en medio de montaje lento DC (DPX). Todas las preparaciones se evaluaron con el microscopio confocal (microscopio Zeiss Axiovert 200M, con un módulo confocal LSM 5 Pascal).

Por otra parte, se llevaron a cabo experimentos utilizando preparaciones de córneas montadas en plano en ratones C57BL/6 y DBA/2J. El objetivo que se perseguía era estudiar la expresión de la proteína ZO-1 en el endotelio de ratones control C57BL/6J, comparándola con ratones con patología glaucomatosa, DBA/2J, a los tres y a los quince meses de edad. Se procedió a eutanasiar a los animales por sobredosis intraperitoneal con pentobarbital sódico al 20% (*Doletha®*). El resto de procedimiento se realizó de la misma manera que en el caso de los experimentos con córneas de conejos, exceptuando algunas modificaciones que se describen a continuación: se permeabilizaron las córneas de ratón con PBS 1X-Triton X-100 al 0.5% durante 1 hora y treinta minutos, y se incubaron en una disolución de bloqueo (PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% en suero normal de cabra al 5%) durante 1 hora para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo anti-ZO-1 (dilución 1:500) en PBS 1X-Triton X-100 al 0.2% durante toda la noche. El resto de procedimiento fue exactamente igual que el realizado con las córneas de conejo.

2.15.2. Secciones transversales de córnea

Crioprotección e inclusión de ojos para hacer secciones de córnea con criostato

Se llevó a cabo la obtención de cortes de córneas de ratones control (C57BL/6J) y de ratones glaucomatosos (DBA/2J). En primer lugar, se realizó una perfusión transcardiaca de ambos modelos de ratón a los 3 y 15 meses de edad con paraformaldehído al 4% diluido en PBS 0.1 M a pH 7.4. Una vez eutanasiados los animales, se enuclearon los ojos, y se diseccionaron las respectivas córneas. A continuación, se fijaron en una disolución de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M a pH 7.4 durante 1 hora a 4°C. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X, sumergiéndose seguidamente las córneas en sacarosa al 33% en PBS 1X para llevar a cabo la crioprotección del tejido, permaneciendo de esta manera hasta el momento de la inclusión en nitrógeno líquido. Dicha inclusión se llevó a cabo depositando el nitrógeno en un Dewar para llevar a cabo el proceso de congelación de los bloques en medio de congelación (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura) teniendo en cuenta el plano de corte deseado, y la orientación de las córneas. La congelación se realizó de manera progresiva para evitar la fracturación del bloque y/o tejido y de este modo evitar problemas en el momento de cortar las secciones. Una vez finalizado el proceso de congelación, se envolvieron los bloques en papel de aluminio para evitar que se secasen hasta el momento de cortarlos con el criostato, y se guardaron a -20°C hasta la realización de los cortes histológicos.

Cortes histológicos

Con cada bloque se realizaron cortes de 10 µm por medio de un Criostato Leica CM1850. Se sacaron los bloques con las córneas del congelador a -20°C y se trasladaron a la cámara del criostato durante aproximadamente 1 hora para que

alcanzasen la temperatura de corte (aproximadamente -26°C). Se fijaron los bloques en el portapiezas, se añadió medio para la congelación de tejido en la base del portapiezas, y se colocaron las piezas encima antes de que se congelasen para que se quedasen adheridas al terminar de congelarse. Una vez pegada la pieza al portapiezas se llevó a cabo el tallaje del bloque, hasta llegar al plano de corte deseado. Para realizar correctamente los cortes se colocaron el ángulo de la cuchilla y la ventana anti-roll adecuadamente y la velocidad de corte se mantuvo constante. Después de seguir el procedimiento descrito, las secciones de córneas se montaron en portas y se almacenaron posteriormente en el congelador de -20°C hasta su posterior utilización para ensayos de inmunofluorescencia.

Inmunohistoquímica con secciones transversales de córnea

Las secciones congeladas se hidrataron con PBS 1X durante 10 minutos y se permeabilizaron las membranas con una solución de PBS 1X-Triton X-100 al 0.25% durante 30 minutos. Para evitar la tinción no específica, se bloquearon las secciones en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, con suero normal de cabra al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubó el anticuerpo primario anti-ZO-1 de conejo (1:125) diluido en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, con suero normal de cabra al 1% a 4°C , durante toda la noche. Posteriormente se lavaron las secciones en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con FITC, obtenido en cabra (1:200), diluyéndose en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, durante 1 hora, en la oscuridad a temperatura ambiente. Después, se hicieron tres lavados con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% y se tiñeron los núcleos con yoduro de propidio diluido en PBS 1X (1:500) durante 10 minutos. Las secciones se montaron finalmente en medio de montaje *Vectashield Fluoromount* (Vector Laboratories), se protegieron de la luz y se guardaron a 4°C hasta su estudio por microscopía confocal.

2.16. Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética \pm la desviación estándar (S.D.). Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos diferentes. Las comparaciones entre medias se realizaron con un análisis de la varianza (ANOVA). Los niveles de significación establecidos han sido: (***) $p < 0.001$ (diferencia extremadamente significativa), (**) $p < 0.01$ (diferencia muy significativa), y (*) $p < 0.05$ (diferencia significativa), tomándose como no significativos (NS) los niveles superiores a 0.05.

Resultados

RESULTADOS

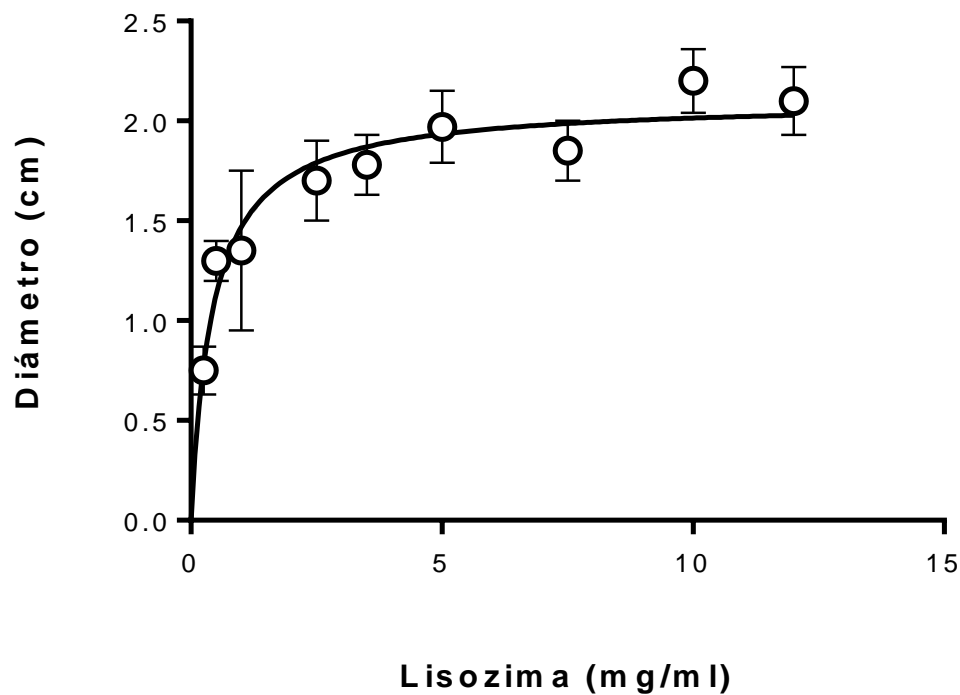
1. Efecto de Ap₄A en los niveles de lisozima y lactoferrina presentes en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda

1.1. Efecto de la aplicación tópica de Ap₄A 100 µM sobre la lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda

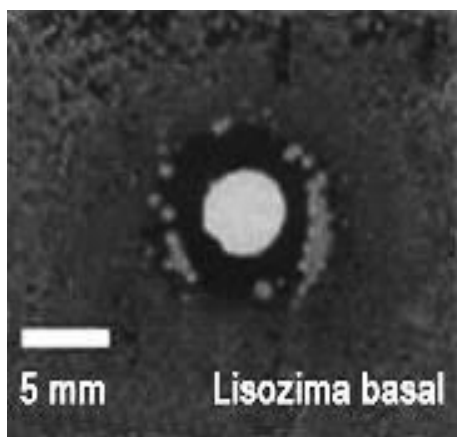
Con el objetivo de evaluar el efecto de Ap₄A sobre la acción de la lisozima en la lágrima de conejo albino de Nueva Zelanda, se realizaron experimentos utilizando el método de difusión en agar, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 16 se muestra un experimento característico que representa los halos de inhibición producidos por la acción bactericida de esta relevante proteína de la lágrima. Para ello, se realizó en primer lugar una curva de calibración de dicha proteína a concentraciones comprendidas entre 0.1 mg/ml y 12 mg/ml, para poder determinar la equivalencia entre el diámetro de los halos de inhibición (cm) con la concentración de la proteína. La gráfica de la Figura 16 A muestra los valores medios de los halos de inhibición correspondientes a las diferentes cantidades probadas. En las imágenes que se muestran en la Figura 16 B, se pueden observar las zonas de lisis de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* debido a la acción de la lisozima alrededor de discos de papel Whatman n°1, los cuales se impregnaron con lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.

A



B



C

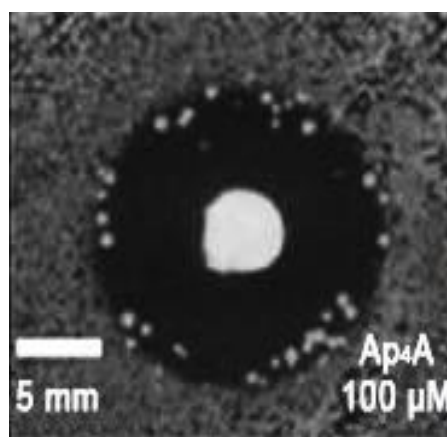


Figura 16. Curva de calibración de la lisozima e imágenes representativas de los halos de inhibición producidos por la lisozima. Se representan experimentos de difusión en agar que muestran los halos de inhibición obtenidos debidos al efecto bactericida de la lisozima sobre la lágrima basal (B), junto al efecto potenciado por Ap₄A (100 µM), 2 h después de la aplicación del dinucleótido (C). Las barras de escala corresponden a 5 mm.

Como se puede observar en las imágenes de la Figura 16, tras la aplicación del dinucleótido Ap₄A (100 µM) se obtuvieron diámetros de lisis mayores en los halos de inhibición de *Micrococcus lysodeikticus* (Figura 16 C) en comparación con la lisis producida por la lisozima basal (Figura 16 B), sin la aplicación del dinucleótido. Este

hallazgo indica que la aplicación tópica del Ap₄A induce un incremento en los niveles de lisozima de la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda.

1.2. Efecto de la aplicación tópica de Ap₄A 100 μ M sobre la concentración de lisozima a lo largo del tiempo en lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda

Con el fin de analizar la evolución temporal del efecto que el dinucleótido Ap₄A, a una concentración 100 μ M, produjo sobre los niveles de lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda, se estudió dicha acción a lo largo de 6 h y se compararon los valores con los basales en ausencia del dinucleótido.

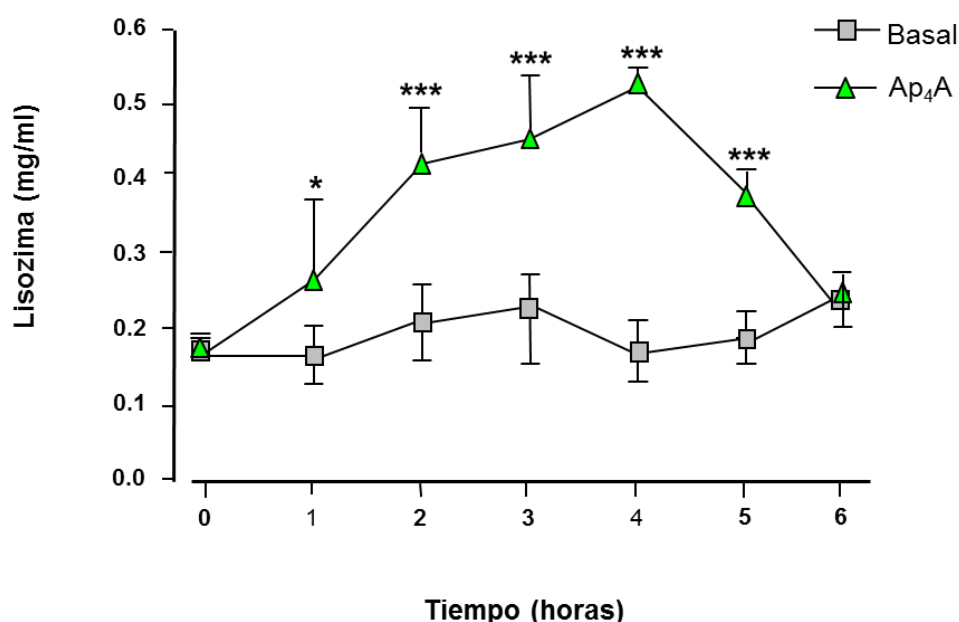


Figura 17. Concentración de lisozima tras la instilación de Ap₄A a lo largo del tiempo en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. El efecto de Ap₄A 100 μ M (triángulos verdes) y de la solución salina (cuadrados grises) sobre la concentración de lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda fue evaluado durante 6 h. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ frente a los valores control).

La aplicación tópica de dosis únicas de Ap₄A (100 μ M, en un volumen final de 10 μ l) causó un aumento gradual de los niveles de lisozima a partir de la primera hora tras la aplicación del nucleótido, los cuales se mantuvieron por encima de los niveles basales durante al menos cuatro horas más, alcanzando un valor máximo a las 2 h

post-instilación, incrementándose los valores de 0.175 ± 0.03 mg/ml en el caso de la lágrima control, a 0.517 ± 0.010 mg/ml en el caso del tratamiento con Ap₄A (100 μ M) (Figura 17).

1.3. Efecto medio del aumento de los niveles de lisozima inducidos por Ap₄A en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda

En la Figura 18 se muestra la concentración de lisozima basal presente en las lágrimas de los animales frente al valor de la concentración media de lisozima tras la aplicación de Ap₄A obtenida para el período entre 2 y 5 h, la cual mostró un aumento significativo en comparación con los valores basales.

Concretamente, el aumento en la concentración de lisozima después de la aplicación de Ap₄A fue del 93% (0.38 ± 0.07 mg/ml).

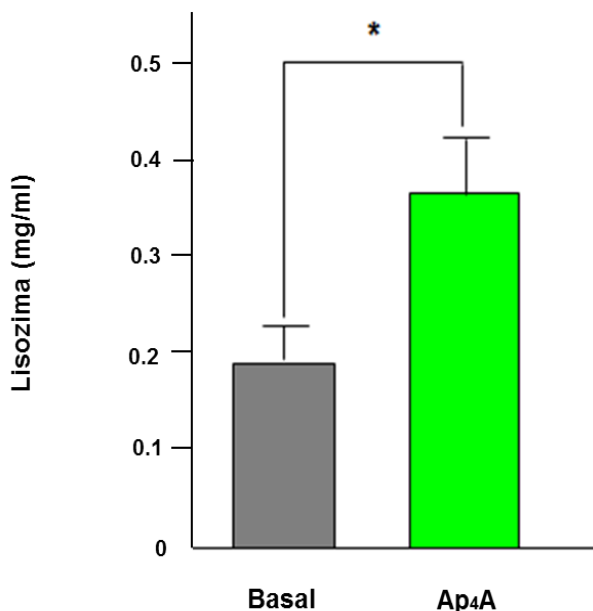


Figura 18. Estudio comparativo del efecto medio producido por Ap₄A (100 μ M) frente a la concentración de lisozima basal de conejos albinos de Nueva Zelanda. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.001$ frente a los valores control).

1.4. Curva concentración-respuesta tras la aplicación tópica de Ap₄A

Se realizaron ensayos para determinar los niveles de lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda tras la aplicación tópica de diversas concentraciones del dinucleótido (10^{-11} a 5×10^{-4} M), con el fin de obtener una curva de concentración-respuesta (n=3) (Figura 19).

Se eligió el tiempo de 2 horas para efectuar dichas medidas, ya que, tal como muestra la figura 17, es a partir de este momento cuando se observa un incremento muy significativo de los niveles de lisozima en la lágrima de los animales.

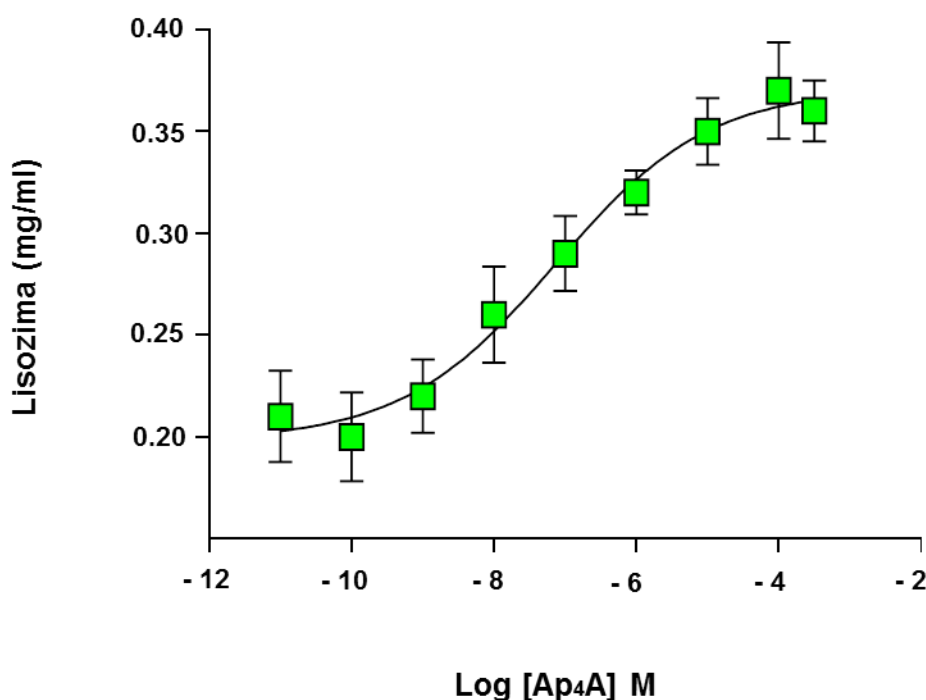


Figura 19. Curva concentración-respuesta del efecto de Ap₄A sobre los niveles de lisozima en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. Cada punto se obtuvo 2 h después de la aplicación del dinucleótido (efecto máximo de Ap₄A). Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

La aplicación de Ap₄A en concentraciones graduales sobre la superficie ocular de los animales generó una curva concentración-respuesta de patrón sigmoide con valores pD₂ (-log EC₅₀) de 7.138 ± 0.52 , lo que correspondió a unos valores de EC₅₀ de 72.7 nM para Ap₄A (Figura 19).

1.5. Efecto de antagonistas de los receptores P2 en el aumento de la concentración de lisozima inducida en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda tras la aplicación tópica de Ap_4A

Para determinar si el efecto de Ap_4A sobre los niveles de lisozima estaba mediado por receptores purinérgicos de tipo P2, se estudió el efecto de un *cocktail* de antagonistas no selectivos de dichos receptores (PPADS, suramina y RB-2) sobre los niveles de lisozima (Figura 20).

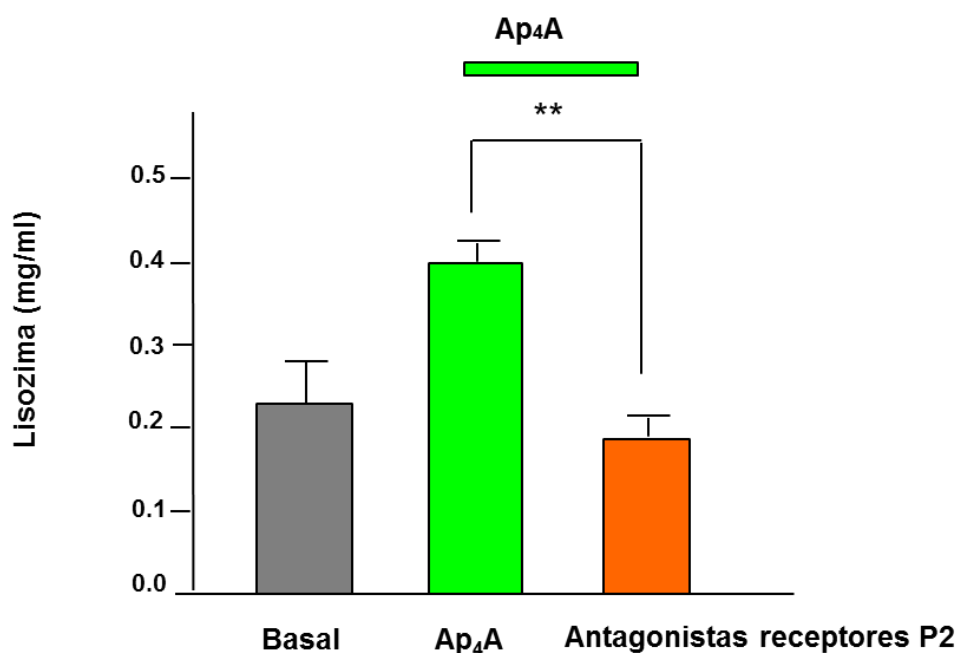


Figura 20. Efecto de un *cocktail* de antagonistas de los receptores P2 (formado por PPADS, suramina y RB-2, cada uno de ellos a concentración 100 μM) tras la aplicación tópica de Ap_4A (100 μM) en la concentración de lisozima presente en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$ frente a los valores correspondientes al tratamiento con Ap_4A sin antagonistas).

El efecto de Ap_4A sobre la producción de lisozima fue significativamente revertido por el *cocktail* de antagonistas de receptores P2, obteniendo valores claramente inferiores en comparación a los encontrados en la lágrima de animales en los que únicamente se instiló Ap_4A 2 h antes, siendo los valores de concentración de lisozima en presencia de los antagonistas similares a los valores control.

1.6. Efecto de la aplicación tópica de Ap₄A 100 µM sobre la concentración de lactoferrina a lo largo del tiempo en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda

Con el fin de estudiar si el dinucleótido Ap₄A inducía un aumento en los niveles de lactoferrina, otra de las proteínas principales de la lágrima, se realizaron experimentos parecidos a los realizados con la lisozima, evaluando esta vez la concentración de lactoferrina en la lágrima mediante la técnica de ELISA, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

En la Figura 21 se recogen los resultados que muestran la evolución temporal del efecto de Ap₄A (100 µM) sobre los niveles de lactoferrina en lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda, comparándolos con los valores basales obtenidos para dicha proteína.

Transcurrida una hora de la aplicación de Ap₄A, se produjo un aumento significativo en la concentración de lactoferrina (83.17 ± 9.89 µg/ml) en comparación con los valores control (68 ± 4 µg/ml, $p < 0.05$), efecto que se incrementó ligeramente a las 2 h y se mantuvo durante otras 2 horas, retornando a continuación a los niveles basales de la lágrima (n=4) (Figura 21).

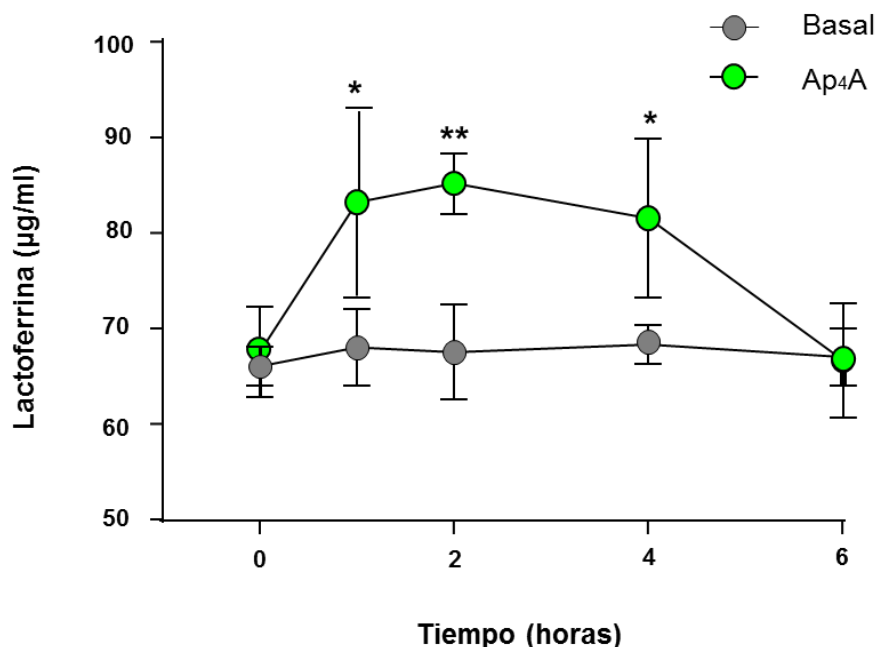


Figura 21. Concentración de lactoferrina tras la instilación de Ap₄A a lo largo del tiempo en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. El efecto de Ap₄A 100 µM (círculos verdes) y de la solución salina (círculos grises) sobre la concentración de lactoferrina en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda se estudió durante 6 h. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* p < 0.05, ** p < 0.01 frente a los valores control).

1.7. Efecto medio del aumento de los niveles de lactoferrina inducidos por Ap₄A en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda

Como se muestra en la Figura 22, el valor de la concentración media de lactoferrina obtenida para el período entre 1 h y 5 h tras la aplicación tópica de Ap₄A mostró un aumento significativo sobre los niveles basales de la proteína. El aumento en la concentración de lactoferrina después de la aplicación tópica de Ap₄A fue de 83.28 ± 1.06 µg/ml frente a 67.06 ± 0.44 µg/ml (valor correspondiente al tratamiento sin el dinucleótido).

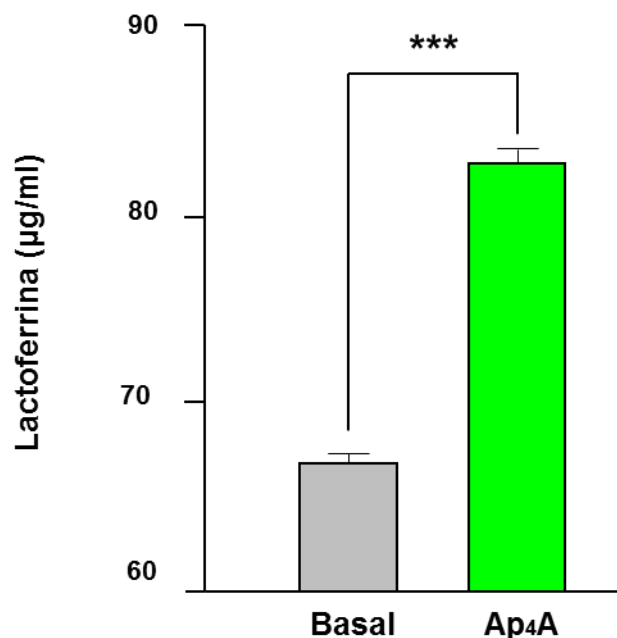


Figura 22. Estudio comparativo del efecto medio producido por Ap₄A (100 µM) y la correspondiente concentración de lactoferrina basal. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (***) $p < 0.001$ frente a los valores control).

1.8. Curva concentración-respuesta tras la aplicación tópica de Ap₄A

Del mismo modo, se realizaron ensayos mediante la técnica ELISA para determinar los niveles de lactoferrina en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda tras el pretratamiento tópico 2 h antes de Ap₄A a concentraciones graduales (10^{-8} a 10^{-3} M), con el fin de obtener la curva de concentración-respuesta del dinucleótido ($n=4$) (Figura 23). Las medidas se realizaron 2 h después de la instilación, debido a que, tal como muestra la Figura 21, el máximo efecto se produjo a dicho tiempo. Ap₄A fue capaz de aumentar los niveles de lactoferrina de una manera dependiente de la concentración y el análisis de la curva permitió el cálculo del valor pD₂ ($-\log EC_{50}$), que fue 5.42 ± 0.17 , equivalente a un EC_{50} de 3.78 µM (Figura 23).

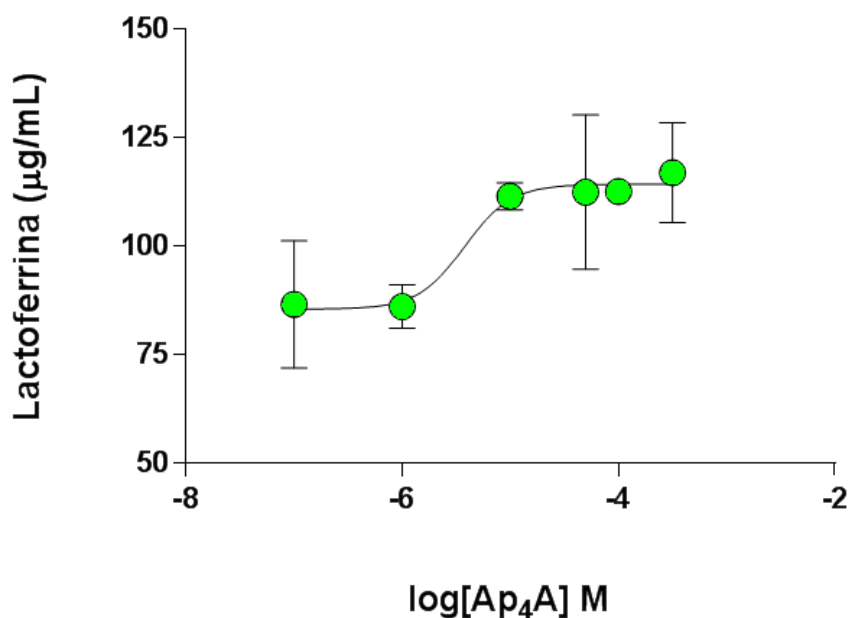


Figura 23. Curva concentración-respuesta del efecto de Ap₄A sobre los niveles de lactoferrina en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. Cada punto se obtuvo 2 h después de la aplicación del dinucleótido (efecto máximo de Ap₄A). Los valores mostrados corresponden a la media ± S.D. de cuatro experimentos independientes.

1.9. Efecto de antagonistas de los receptores P2 en el aumento de la concentración de lactoferrina inducida en lágrima tras la aplicación tópica de Ap₄A

Para analizar si los receptores P2 median el efecto de Ap₄A sobre los niveles de lactoferrina en la lágrima de conejo albino de Nueva Zelanda, se estudió el efecto de un *cocktail* de antagonistas no selectivos de receptores P2 (PPADS, suramina y RB-2) sobre los niveles de dicha proteína.

El efecto de Ap₄A sobre los niveles de lactoferrina se revirtió significativamente tras la instilación de la mezcla de antagonistas no selectivos de receptores P2, obteniendo valores muy inferiores en comparación a los encontrados en la lágrima de animales en los que solo se instiló Ap₄A 2 h antes. En concreto, los valores disminuyeron de 85.17

$\pm 3.29 \mu\text{g/ml}$ en la lágrima tratada con el dinucleótido hasta $43.36 \pm 12.72 \mu\text{g/ml}$ en el caso de la lágrima de conejos en los que se instilaron antagonistas no selectivos de receptores P2) (Figura 24).

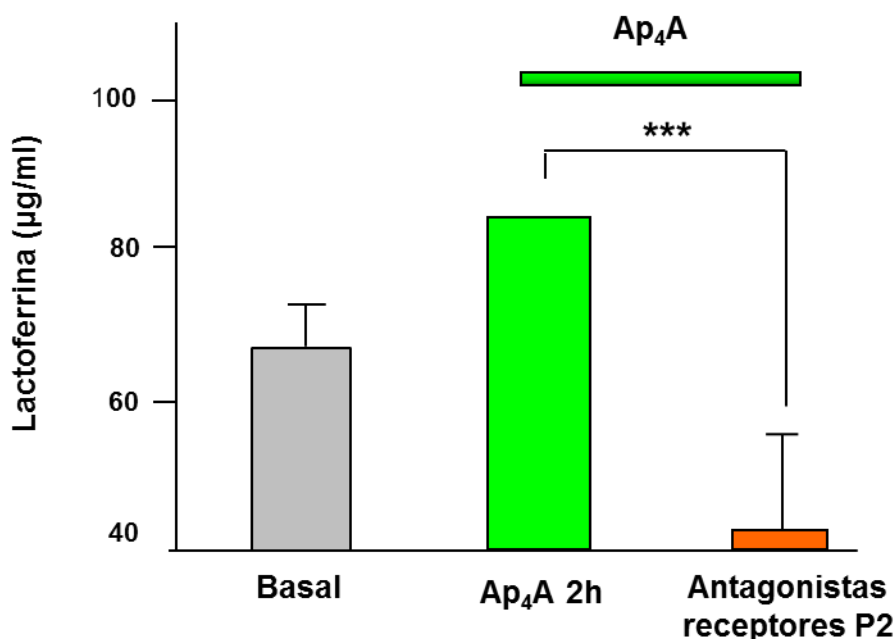


Figura 24. Efecto de un *cocktail* de antagonistas de los receptores P2 (formado por PPADS, suramina y RB-2, cada uno de ellos a concentración $100 \mu\text{M}$) tras la aplicación tópica de Ap₄A ($100 \mu\text{M}$) en la concentración de lactoferrina presente en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (** $p < 0.001$ frente a los valores correspondientes al tratamiento con Ap₄A sin antagonistas).

2. Estudio del efecto de los dinucleósido polifosfatos y mononucleótidos sobre la permeabilidad de la barrera del epitelio corneal

Con el objetivo de conocer el efecto de diversos dinucleósido polifosfatos (Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A) y mononucleótidos (ADP, ATP, UDP y UTP) sobre la función de la barrera paracelular en cultivos de células HCLE, se realizaron ensayos midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) tras la aplicación de dichos compuestos a concentración $100 \mu\text{M}$ siguiendo el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos.

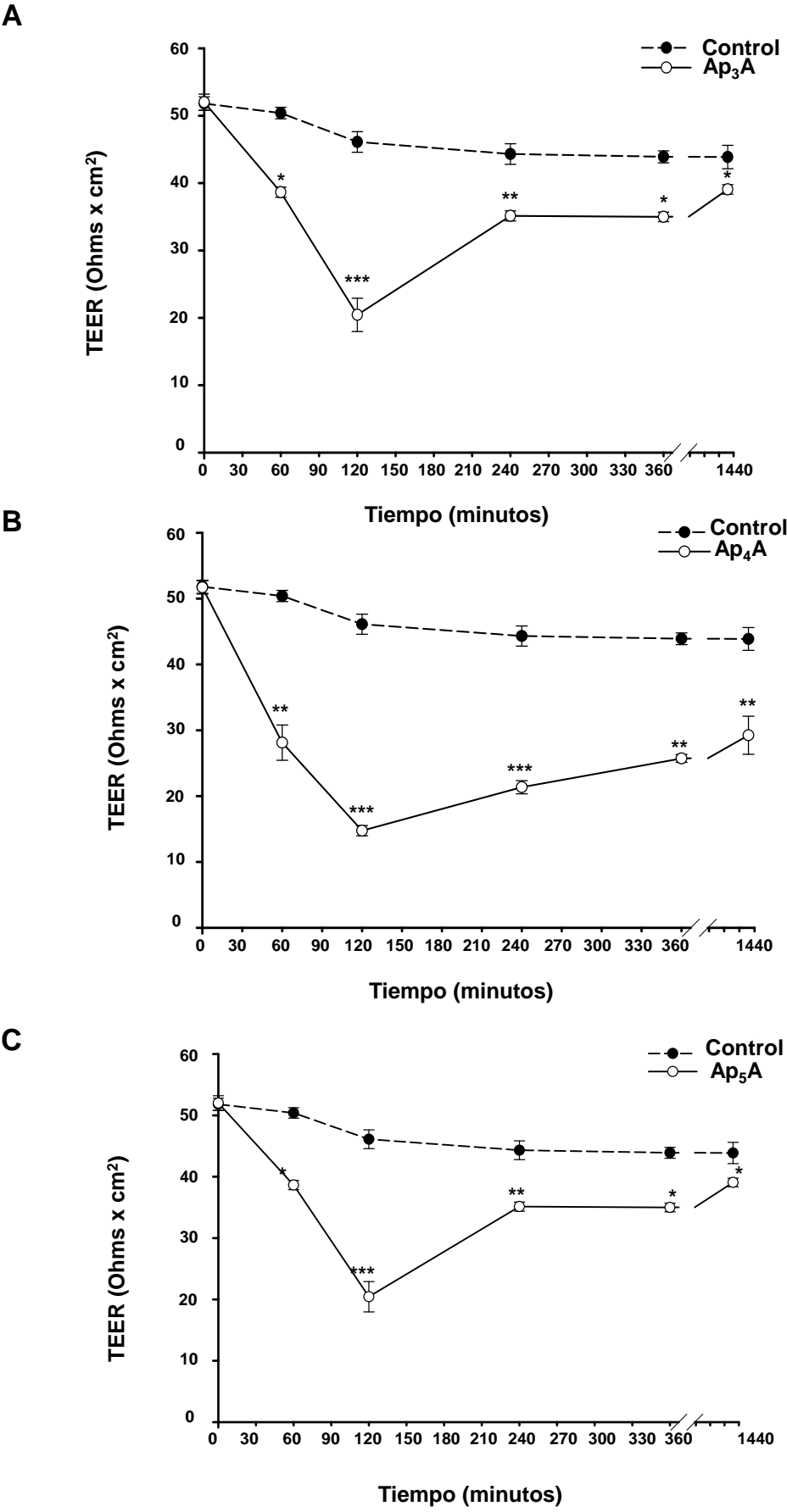


Figura 25. Medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células HCLE después de su tratamiento con distintos dinucleótidos. Las células se expusieron a Ap₃A (100 µM) (A), Ap₄A (100 µM) (B) y Ap₅A (100 µM) (C) y las medidas de TEER se tomaron a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 24 h). Los valores mostrados corresponden a la media ± S.D. de cuatro experimentos independientes (* p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 frente a los valores control).

En todos los casos se detectó una disminución de TEER tras la aplicación de los dinucleótidos, lo cual indicó que se estaba produciendo un aumento en la permeabilidad de la barrera corneal (Figura 25). Ap₃A y Ap₅A produjeron reducciones de TEER de, aproximadamente, 59% y 56% a las 2 h (19.04 ± 2.54 Ohms x cm² y 20.44 ± 2.47 Ohms x cm², respectivamente), en comparación con los valores control (46.10 ± 1.53 Ohms x cm²; $p < 0.001$, $n=4$).

Transcurridas 6 h de la aplicación de los dinucleótidos, los valores de TEER empezaron a regresar progresivamente en todos los casos hacia los valores control. La mayor reducción se obtuvo con el dinucleótido Ap₄A, el cual produjo, a la primera hora, un 44% de disminución de TEER ($p < 0.01$, $n = 4$), obteniéndose las mayores reducciones a las 2 h y 4 h (14.75 ± 0.78 Ohms x cm² (68% de reducción) y 21.35 ± 1.0 Ohms x cm² (52% de reducción), respectivamente), en comparación con los respectivos valores control (46.10 ± 1.53 Ohms x cm² y 44.31 ± 1.53 Ohms x cm²; $p < 0.001$, $n=4$) (Figura 25).

En los ensayos realizados con los mononucleótidos trifosfato UTP y ATP (Figura 26), se obtuvieron valores de TEER significativamente inferiores 2 h después del tratamiento (19.30 ± 0.96 Ohms x cm² (62.58% de reducción) y 20.94 ± 0.96 Ohms x cm² (59.42% de reducción), respectivamente) con respecto a los valores control transcurridas 2 h (51.58 ± 3.30 Ohms x cm²). A partir de este momento, los valores fueron regresando progresivamente, a lo largo de los tiempos estudiados, hacia los valores control (Figura 26).

En el caso de los mononucleótidos difosfato, ADP y UDP, no se produjeron reducciones tan marcadas de TEER (Figura 27) en comparación a las obtenidas con los dinucleótidos (Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A), y los mononucleótidos monofosfato (UTP y ATP).

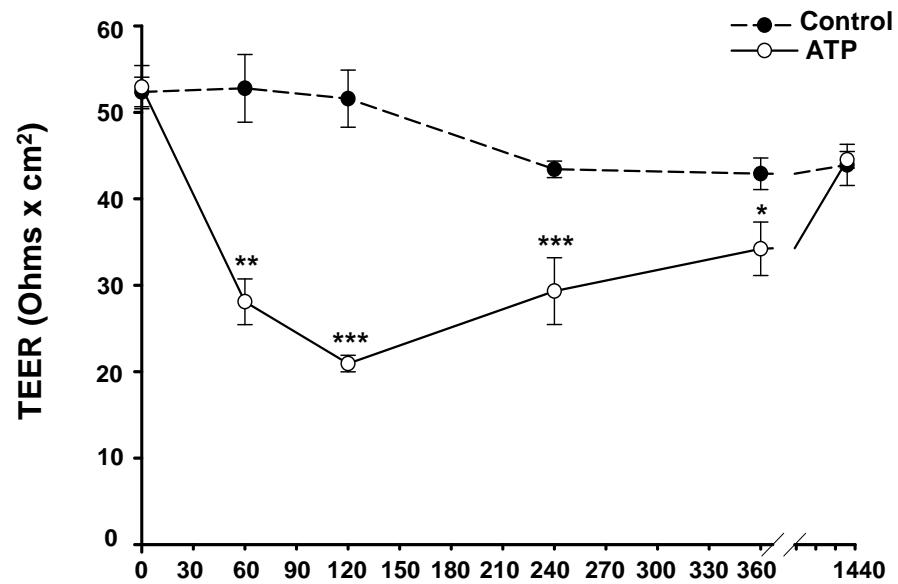
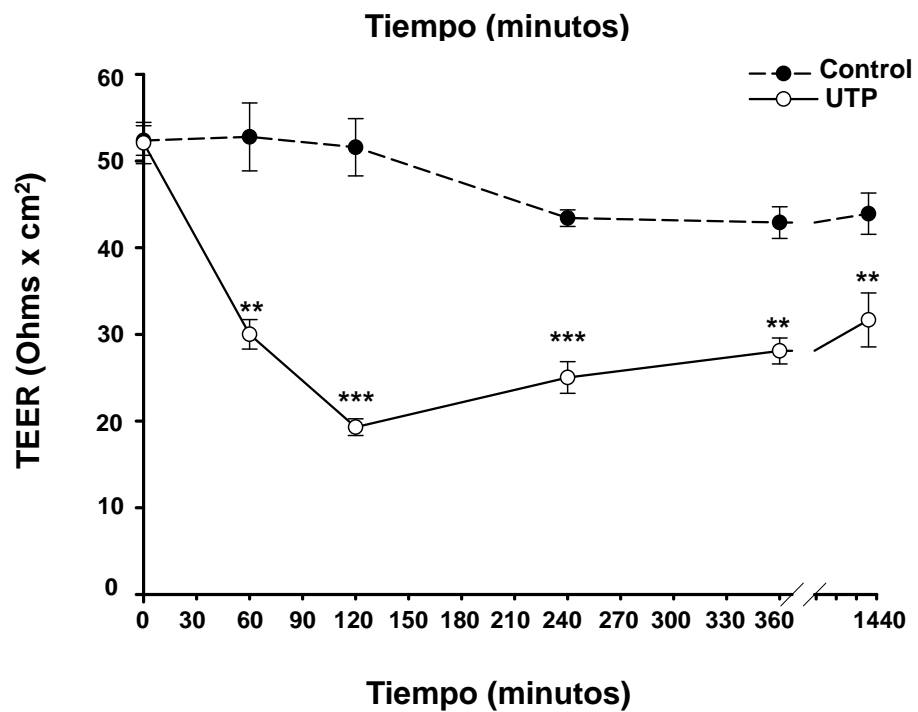
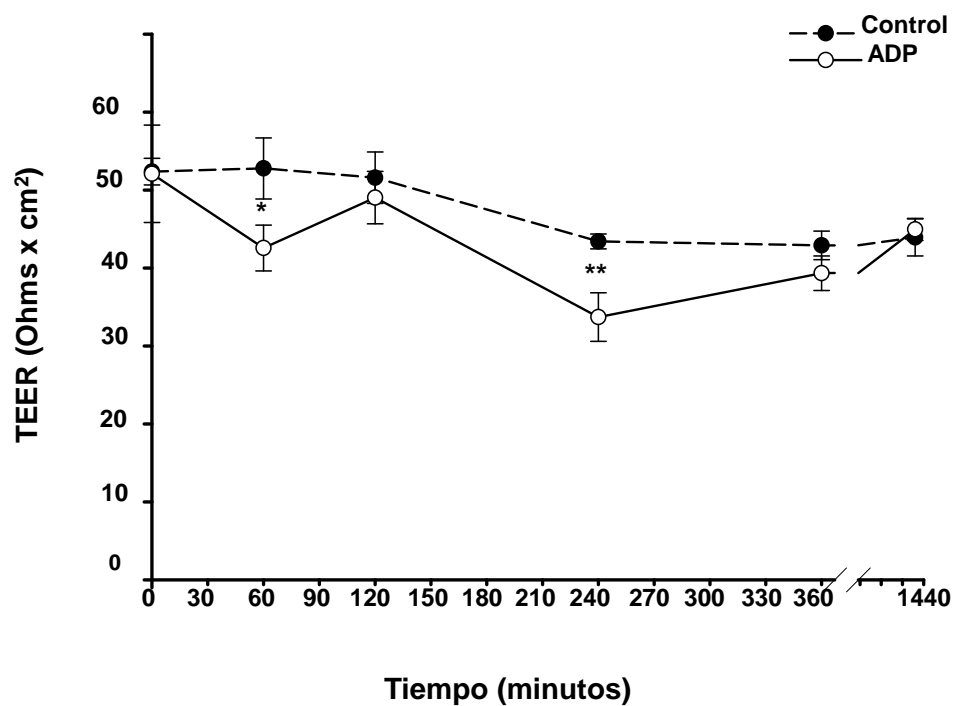
A**B**

Figura 26. Medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células HCLE después de su tratamiento con distintos mononucleótidos trifosfato. Las células se expusieron a ATP (100 μ M) (A) y UTP (100 μ M) (B). Las medidas de TEER se tomaron a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 24 h). Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente a los valores control).

A



B

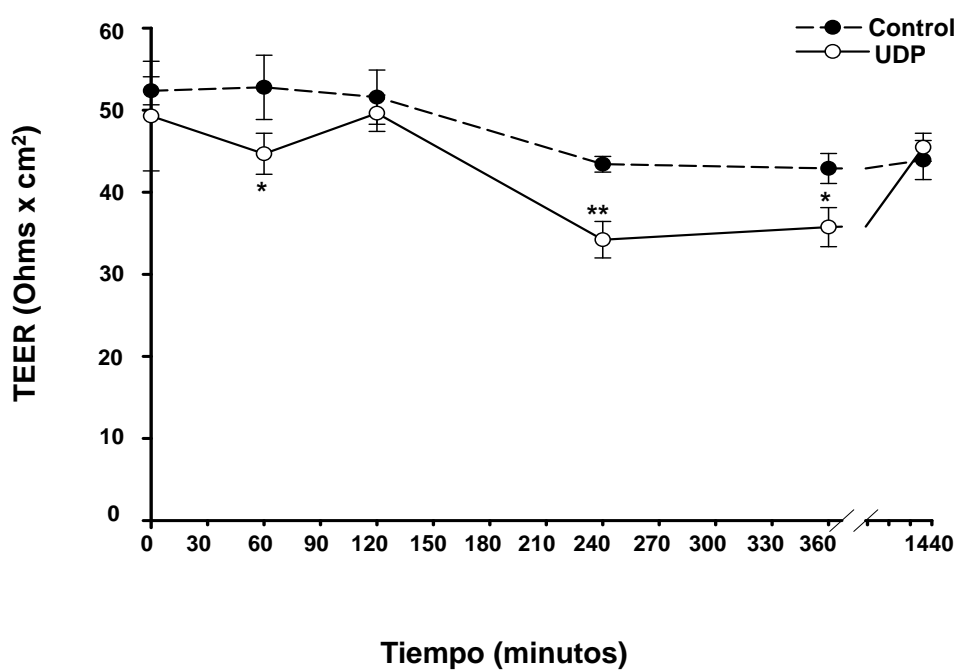


Figura 27. Medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células HCLE después de su tratamiento con distintos mononucleótidos difosfato. Las células se expusieron a ADP (100 μ M) (A) y UDP (100 μ M) (B). Las medidas de TEER se tomaron a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 24 h). Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente a los valores control).

3. Estudio del efecto de Ap₄A sobre los niveles proteicos de las proteínas integrantes de las TJ y la fosforilación de ERK

Una vez determinado el efecto que ejercen los mononucleótidos y dinucleótidos sobre la permeabilidad del epitelio corneal (“función de barrera”) y teniendo en cuenta que el dinucleótido Ap₄A desencadenó la mayor reducción de TEER, se seleccionó dicho compuesto para analizar su efecto sobre los niveles proteicos de tres de las proteínas claves constituyentes de las TJ del epitelio corneal: ZO-1, ocludina y claudina-7.

3.1. Efecto de Ap₄A sobre los niveles proteicos de las TJ a distintos tiempos

Con el objetivo de estudiar el efecto producido por Ap₄A sobre los niveles de expresión de tres de las proteínas constituyentes de las TJ (ZO-1, ocludina y claudina-7), se expusieron las células a pretratamiento con Ap₄A 100 μ M durante 5 minutos y se analizaron mediante Western Blot los niveles proteicos de las TJ a diferentes tiempos (1 h, 2 h, 6 h y 24 h) (Figuras 28 y 29).

El pretratamiento de cultivos de células HCLE con Ap₄A (100 μ M) durante 5 minutos indujo una disminución en los niveles de estas tres proteínas constituyentes de las TJ, en comparación con los niveles de proteínas correspondientes a los controles (células no tratadas con el dinucleótido). En las tres proteínas se observó una reducción significativa a las 2 h del pre-tratamiento con Ap₄A [% de reducción: ZO-1 (59.3 \pm 19.1%), ocludina (57.9 \pm 21.5%) y claudina-7 (58.8 \pm 18.6%)] en comparación con las células utilizadas como control ($p < 0.01$, $n=4$) (Figuras 28 y 29).

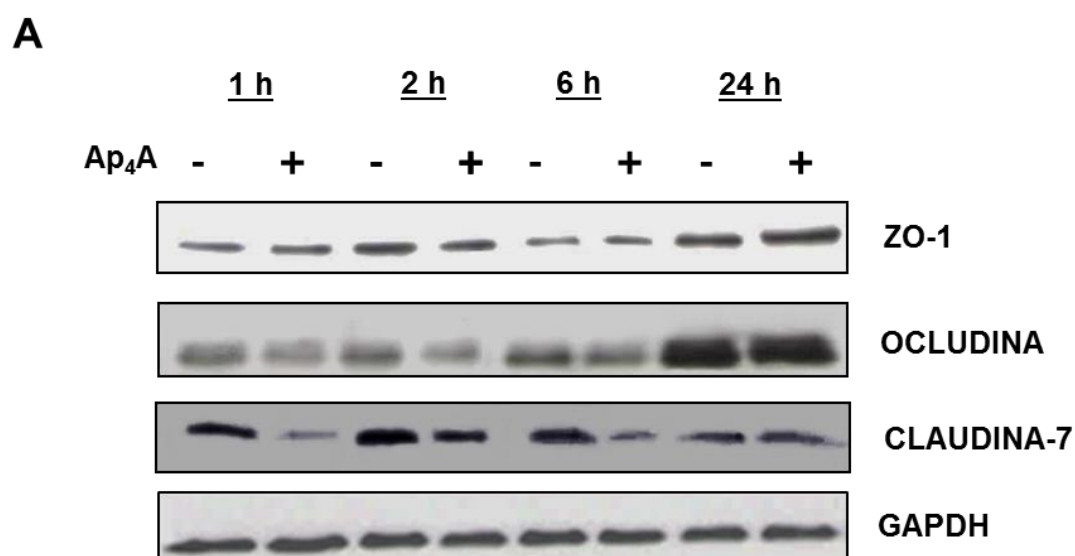


Figura 28. Efecto de Ap₄A sobre los niveles de proteínas constituyentes de las TJ en células HCLE.
(A) Imagen representativa del análisis por Western Blot correspondiente a las proteínas constituyentes de las TJ (ZO-1, ocludina y claudina-7) a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24 h), tras la exposición de 5 minutos de las células HCLE a Ap₄A (100 μ M).

Además de los estudios realizados con Ap₄A sobre su efecto en los niveles proteicos de las TJ, se llevaron a cabo ensayos similares aplicando el mononucleótido UTP (100 μ M). Este compuesto también es un agonista del receptor P2Y₂ y se seleccionó al ser el mononucleótido que produjo valores de TEER más reducidos (Figura 26 B).

Los experimentos realizados tras la aplicación de UTP, mostraron una reducción en la expresión de las proteínas [% de reducción: ZO-1 (69.3 \pm 40.1%) y ocludina (64.6 \pm 53.4%) a las 2 h]. Se puede apreciar una tendencia a la disminución de claudina-7, aunque no se llega a alcanzar valores significativos (18.7 \pm 53.6%) en esta última (Figuras 30 y 31).

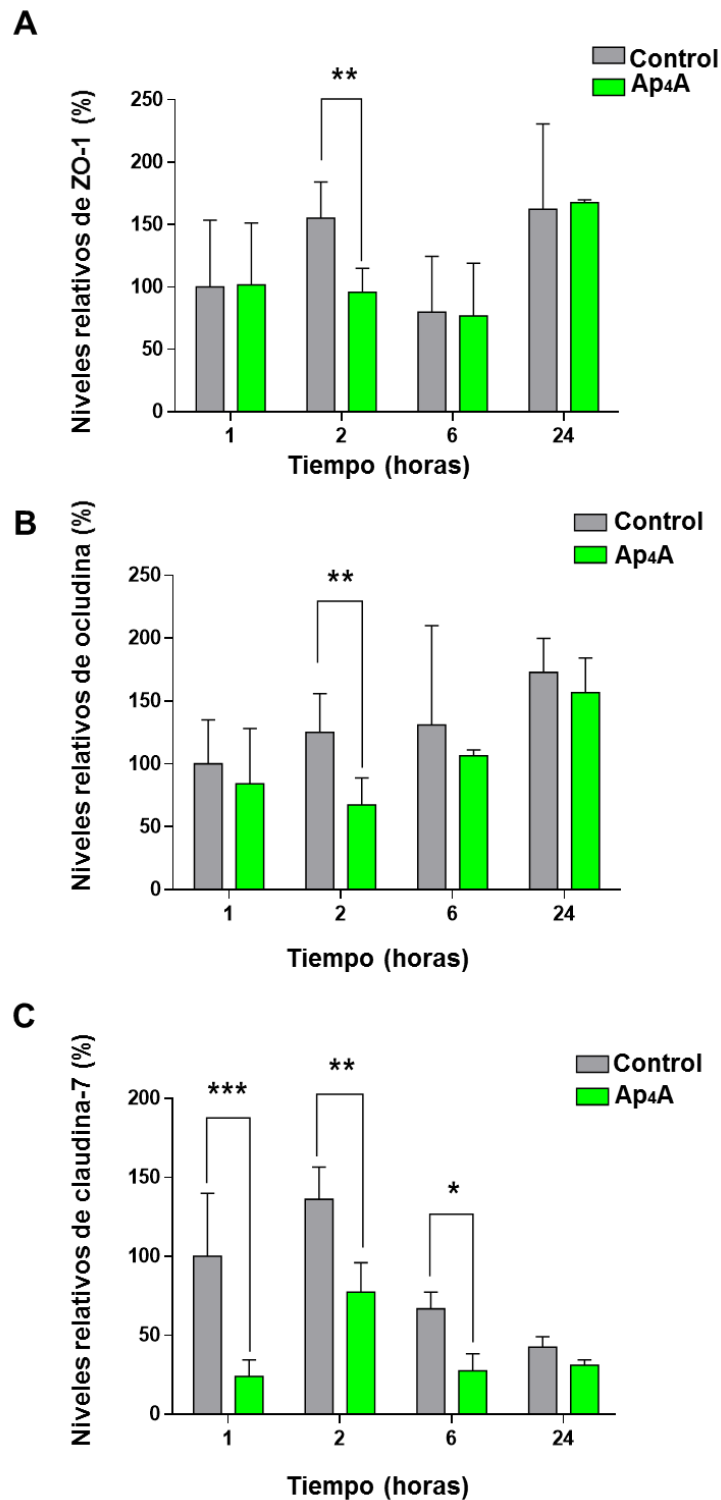


Figura 29. Cuantificación relativa de las intensidades de banda de la proteína citoplasmática ZO-1 y las proteínas de transmembrana ocludina y claudina-7. La intensidad de las bandas obtenidas por Western Blot se cuantificó mediante análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos con respecto al control de la primera hora. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente a sus correspondientes controles sin el dinucleótido Ap₄A).

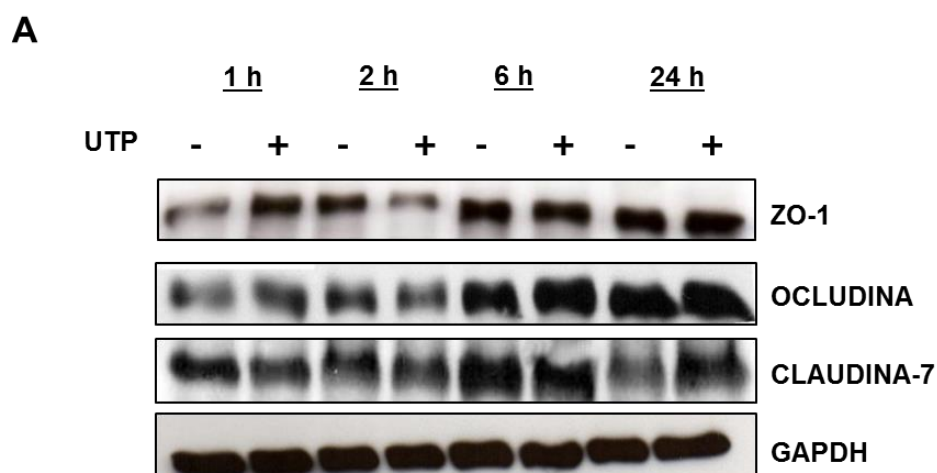


Figura 30. Efecto de UTP sobre los niveles de proteínas constituyentes de las TJ en células HCLE. (A) Imagen representativa del análisis por Western Blot correspondiente a las proteínas constituyentes de las TJ (ZO-1, ocludina y claudina-7) a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24 h), tras la exposición de 5 minutos de las células HCLE a Ap_4A (100 μM).

3.2. Efecto de distintas concentraciones del dinucleótido Ap_4A sobre los niveles proteicos de las TJ en células HCLE

Se incubaron las células HCLE durante 5 minutos con Ap_4A a diferentes concentraciones (10 nM, 0.1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM y 300 μM) y se recogieron a las 2 h, para conocer si este compuesto afectaba a los niveles proteicos de las TJ (en concreto, se evaluaron los niveles de la proteína ZO-1), así como determinar a qué concentración del dinucleótido se originaban estos posibles cambios (Figura 32).

Como puede observarse en la Figura 32, a partir de concentraciones de Ap_4A de 10 μM , se obtuvieron los mayores efectos sobre los niveles de ZO-1, en comparación con los valores control (en ausencia de tratamiento con el dinucleótido), con una reducción de la expresión de la proteína del 59.69%.

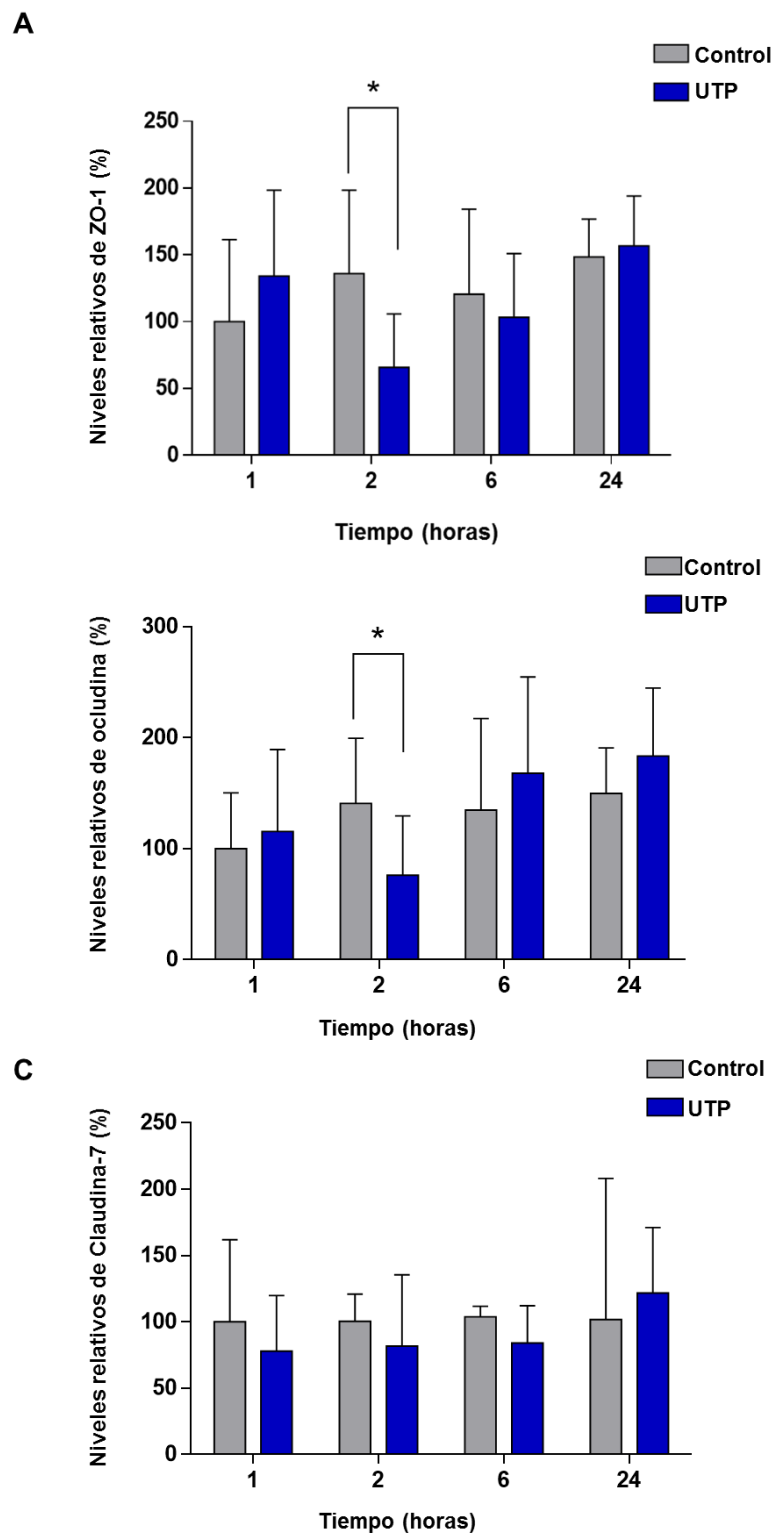


Figura 31. Cuantificación relativa de las intensidades de banda de la proteína citoplasmática ZO-1 y las proteínas de membrana ocludina y claudina-7. La intensidad de las bandas obtenidas por Western Blot se cuantificó mediante análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos con respecto al control de la primera hora. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ frente a sus correspondientes controles sin el mononucleótido UTP).

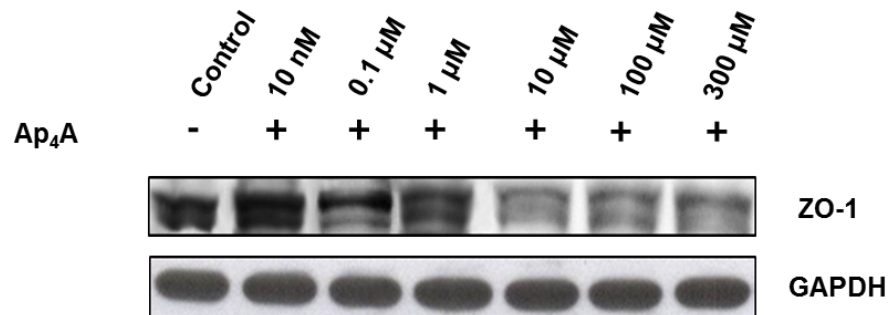
3.3. Activación de ERK 1/2 tras la aplicación de Ap₄A a concentración fija de 100 μ M sobre las células HCLE

Está descrito que el dinucleótido Ap₄A a través de la estimulación del receptor P2Y₂ (Mediero *et al.*, 2006) es capaz de activar distintas cascadas de señalización celular, tales como la ruta de las ERK1/2 en células del epitelio corneal de conejo. Por ello, en el presente trabajo se analizó si dicha activación se producía también en las células de epitelio corneal humano HCLE.

Como se muestra en la Figura 33, el tratamiento con Ap₄A indujo la activación de ERK1/2 en las células HCLE. A lo largo de todos los tiempos estudiados se observó un incremento significativo en la fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con Ap₄A (100 μ M) en comparación con los correspondientes controles (en ausencia del dinucleótido). El aumento máximo se produjo 2 h después del tratamiento con Ap₄A, detectándose un incremento de los valores entorno al triple.

Estos resultados confirman que efectivamente bajo estas condiciones experimentales se está produciendo la activación de dicha ruta en las células HCLE.

A



B

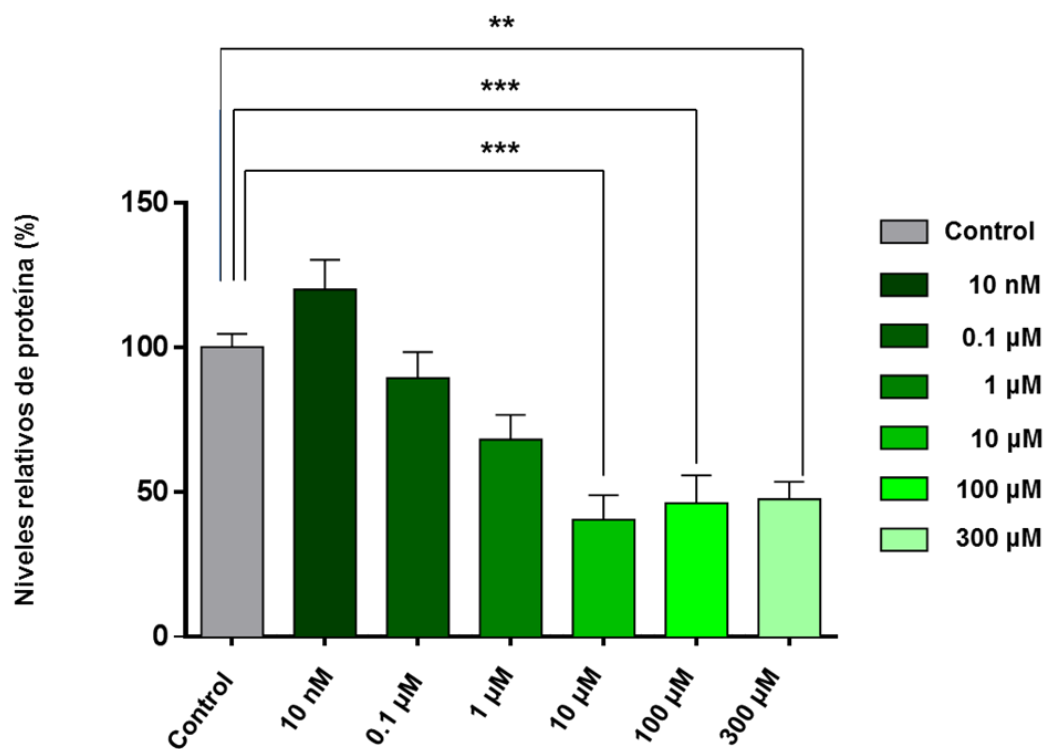


Figura 32. Efecto de distintas concentraciones del dinucleótido Ap₄A sobre los niveles proteicos de ZO-1 en células HCLE. (A) Imagen representativa del análisis por Western Blot correspondiente a la proteína constituyente de las TJ ZO-1, 2 h después de la exposición de las células HCLE a distintas concentraciones de Ap₄A durante 5 minutos. (B) Cuantificación relativa de las intensidades de las bandas de Western Blot. La señal de Western Blot se cuantificó por análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos con respecto al control. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$ y p *** < 0.001 frente a los valores pertenecientes al control).

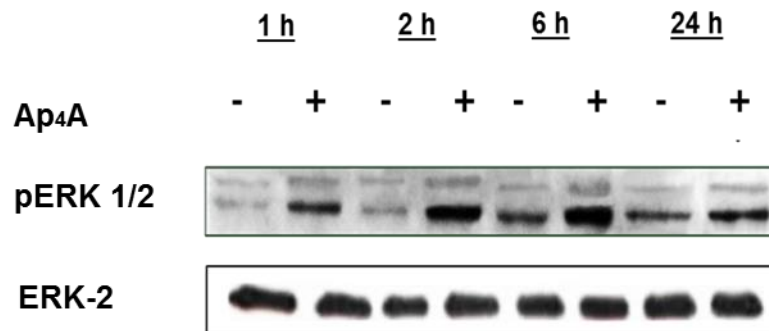
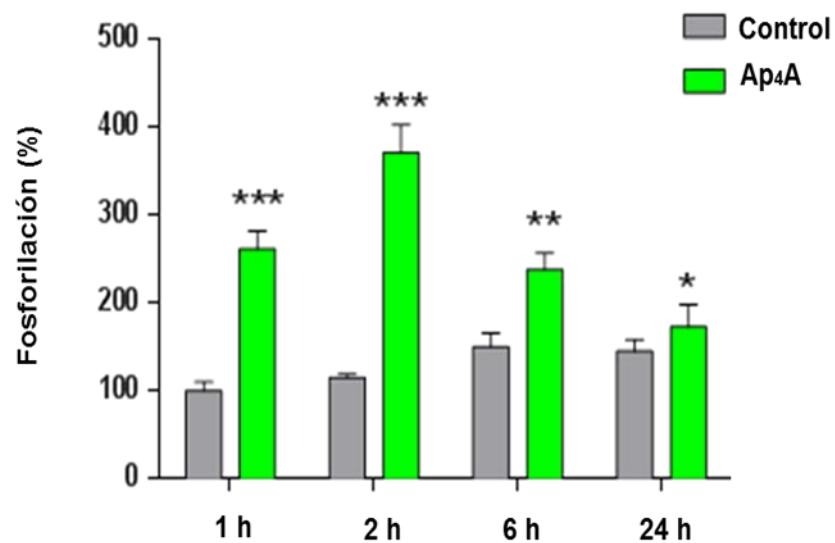
A**B**

Figura 33. Efecto de Ap₄A sobre la activación de ERK 1/2 en células HCLE. (A) Imagen representativa del análisis por Western Blot mostrando la activación de ERK 1/2 tras la exposición de las células al dinucleótido Ap₄A (100 μ M) a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24 h). (B) Cuantificación relativa de las intensidades de las bandas de Western Blot. La señal de Western Blot se cuantificó por análisis densitométrico, utilizándose ERK 2 como control de carga y normalizándose los datos con respecto al control de la primera hora. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y p *** < 0.001 frente a los valores control sin el dinucleótido Ap₄A).

3.4. Evaluación de la implicación del receptor P2Y₂ y la cascada de señalización ERK 1/2 en el efecto inducido por Ap₄A sobre las TJ de células de epitelio corneal humano

En el epitelio de la córnea se ha demostrado previamente que, funciones de Ap₄A tales como la cicatrización de heridas corneales, están mediadas por la estimulación de receptores P2Y₂ y la consiguiente activación de ERK 1/2 (Mediero *et al.*, 2008).

Con el fin de comprobar la implicación de dichos receptores en el efecto que Ap₄A produce en la disminución de la expresión proteica de ZO-1, ocludina y claudina-7, se procedió en primer lugar al silenciamiento del receptor P2Y₂ mediante siRNA, y, posteriormente, se realizaron ensayos para estudiar la activación de ERK 1/2.

3.4.1. Análisis de la implicación del receptor P2Y₂ en el efecto de Ap₄A sobre las TJ

Para la realización de dichos estudios, el primer paso consistió en la puesta a punto de la transfección del siRNA tal como se describe en Materiales y Métodos, así como la determinación de las mejores condiciones para el silenciamiento del receptor P2Y₂ (Figura 34). Para ello, se transfectó una mezcla de siRNAs con el fin de inducir el silenciamiento del receptor P2Y₂, utilizándose una combinación de dos secuencias individuales de siRNA (5'-CAACAUGGCCUACAAGGUUUU-3') y (5'-GAACUGACAUGCAGAGGAUUU-3'), descritas previamente (Boucher *et al.*, 2010).

Como se muestra en la figura 34, a una concentración de 50 nM y transcurridas 24 h ya fue posible detectar una reducción de, aproximadamente, el 49.24%.

El silenciamiento más eficaz se produjo a las 48 h (83.83%), a una concentración de siRNA de 50 nM, por lo que estas fueron las condiciones seleccionadas para la realización de los estudios encaminados a determinar la implicación del receptor P2Y₂ en la acción de Ap₄A sobre las TJ.

Los experimentos realizados utilizando la mezcla de siRNA a concentraciones de 100 nM no produjeron reducciones tan marcadas, siendo estas de 29.55% y 44.3%, a las 24 h y 48 h, respectivamente (Figura 34).

Utilizando las condiciones de silenciamiento previamente comentadas, se procedió a realizar la transfección de la mezcla de los siRNAs y al posterior tratamiento con el dinucleótido durante 5 minutos, para finalmente analizar, transcurridas 2 h, los niveles proteicos de las proteínas integrantes de las TJ (ZO-1, ocludina y claudina-7), así como la fosforilación de ERK 1/2.

Como era de esperar, 2 h después del tratamiento con Ap₄A, la fosforilación de ERK 1/2 se incrementó un 69% en comparación con el control, y disminuyeron los niveles de expresión de tres de las proteínas que forman parte de las TJ [% de reducción: ZO-1 (35 ± 7%), ocludina (26 ± 5%), y claudina-7 (48 ± 4%)] (Figura 35). Tras la aplicación de los siRNA frente al receptor P2Y₂, estos valores se asemejan a los valores control, al igual que ocurre con la fosforilación de las ERK 1/2 (n=4, Figura 35).

Estos resultados confirman que el efecto de Ap₄A está mediado por la activación de receptores P2Y₂, e indican que la estimulación de dicho receptor induce la activación de la cascada de señalización ERK 1/2, la cual mediaría el efecto de Ap₄A sobre las TJ.

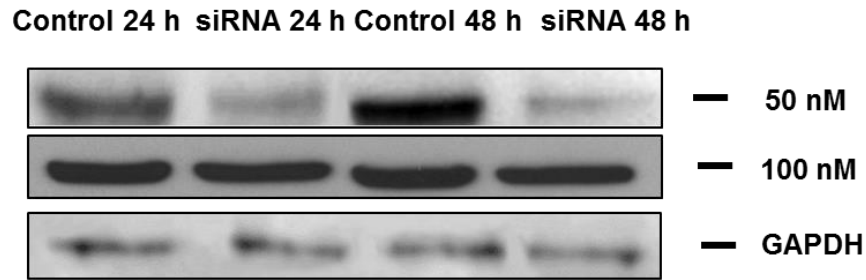
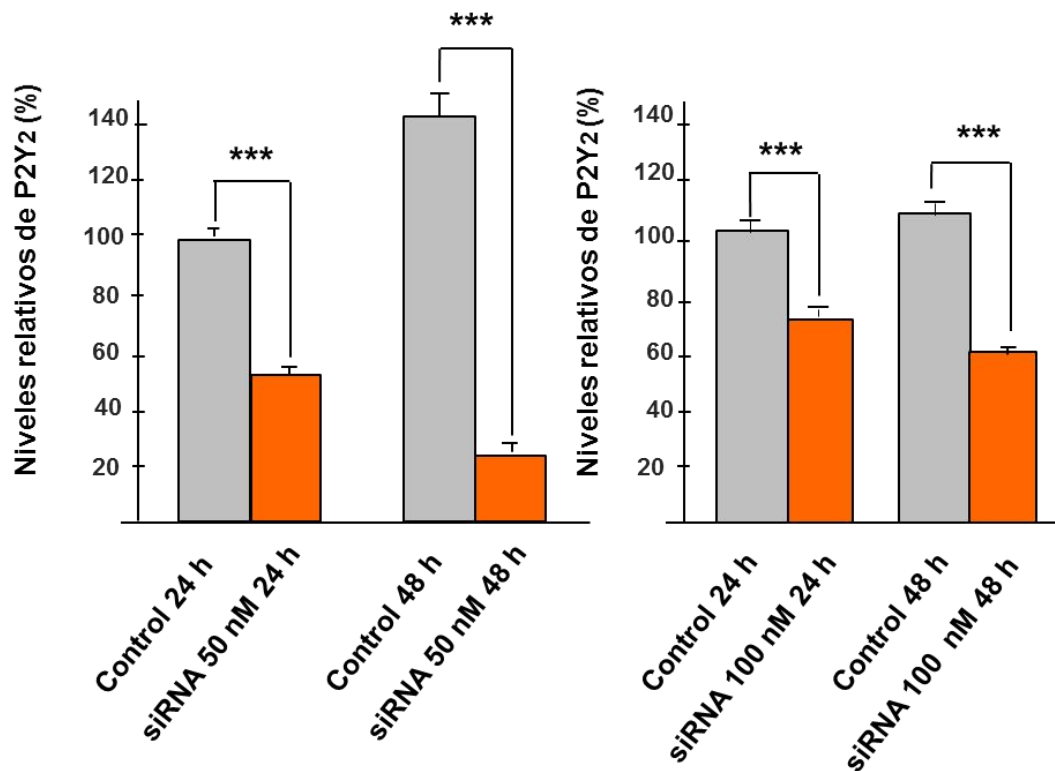
A**B**

Figura 34. Niveles proteicos del receptor P2Y₂ tras el silenciamiento con siRNA en células HCLE.

(A) Análisis mediante Western Blot mostrando la expresión del receptor P2Y₂, 24 y 48 h después de la transfección del siRNA a distintas concentraciones (50 nM y 100 nM). (B) Cuantificación relativa de las intensidades de banda del Western Blot. La señal de Western Blot se cuantificó por análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos con respecto al control de 24 h. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (***) $p < 0.001$ frente a los valores control).

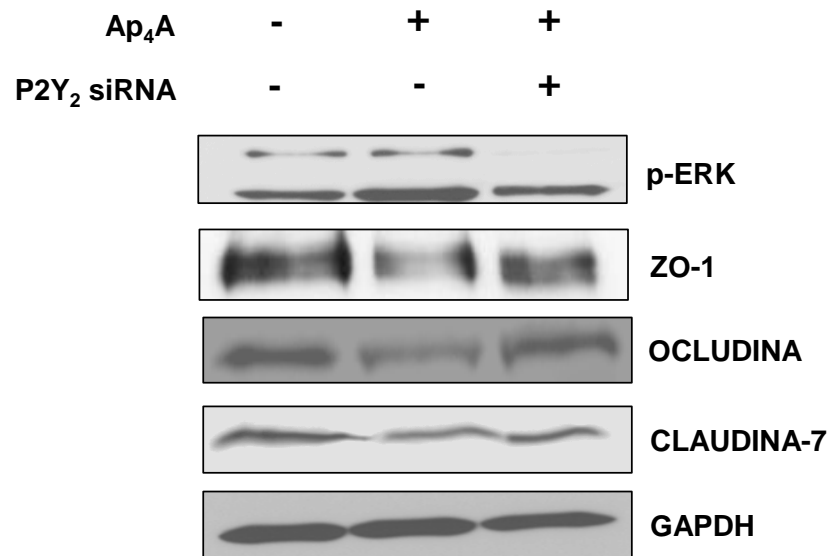
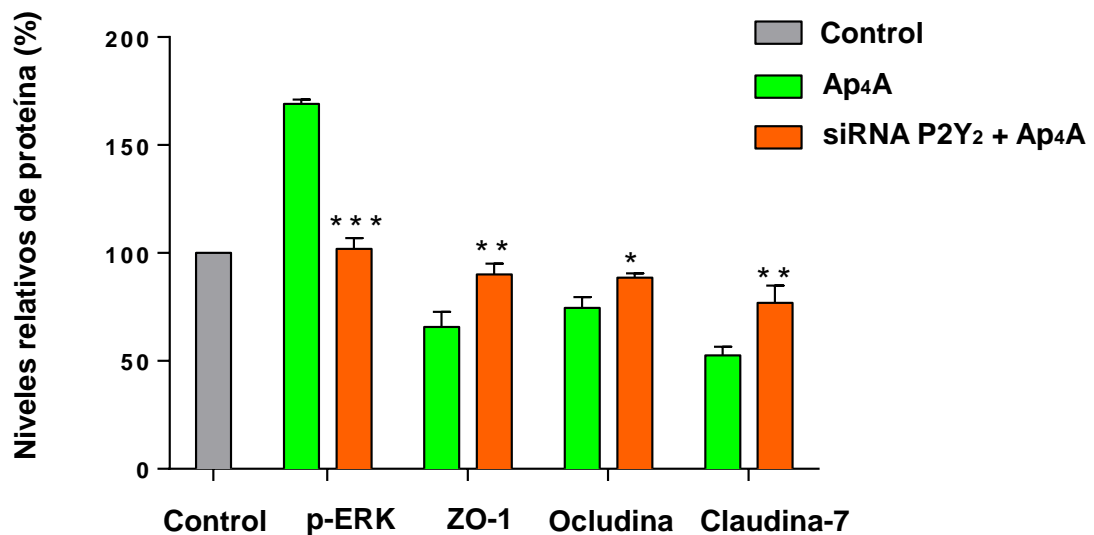
A**B**

Figura 35. Estudio de la participación de los receptores P2Y₂ en el efecto de Ap₄A sobre las proteínas integrantes de las TJ en células HCLE. (A) Imagen representativa del análisis por Western Blot mostrando los efectos de Ap₄A (100 μ M) y de los siRNA (50 nM) frente a P2Y₂ sobre la activación de ERK 1/2 y los niveles de proteínas constituyentes de las TJ de las células HCLE. (B) Cuantificación relativa de las intensidades de banda del Western Blot. La señal de Western Blot se cuantificó por análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos respecto al control. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente a los correspondientes tratamientos de Ap₄A solo).

3.4.2. Evaluación de la implicación de la cascada de señalización ERK 1/2 en el efecto inducido por Ap₄A sobre las TJ de células HCLE

Con el fin de confirmar la implicación de la cascada de las ERK 1/2 en relación a los cambios en los niveles proteicos de las TJ inducidos por Ap₄A, se llevaron a cabo ensayos en presencia de U0126, inhibidor de esta ruta de señalización (Figura 36).

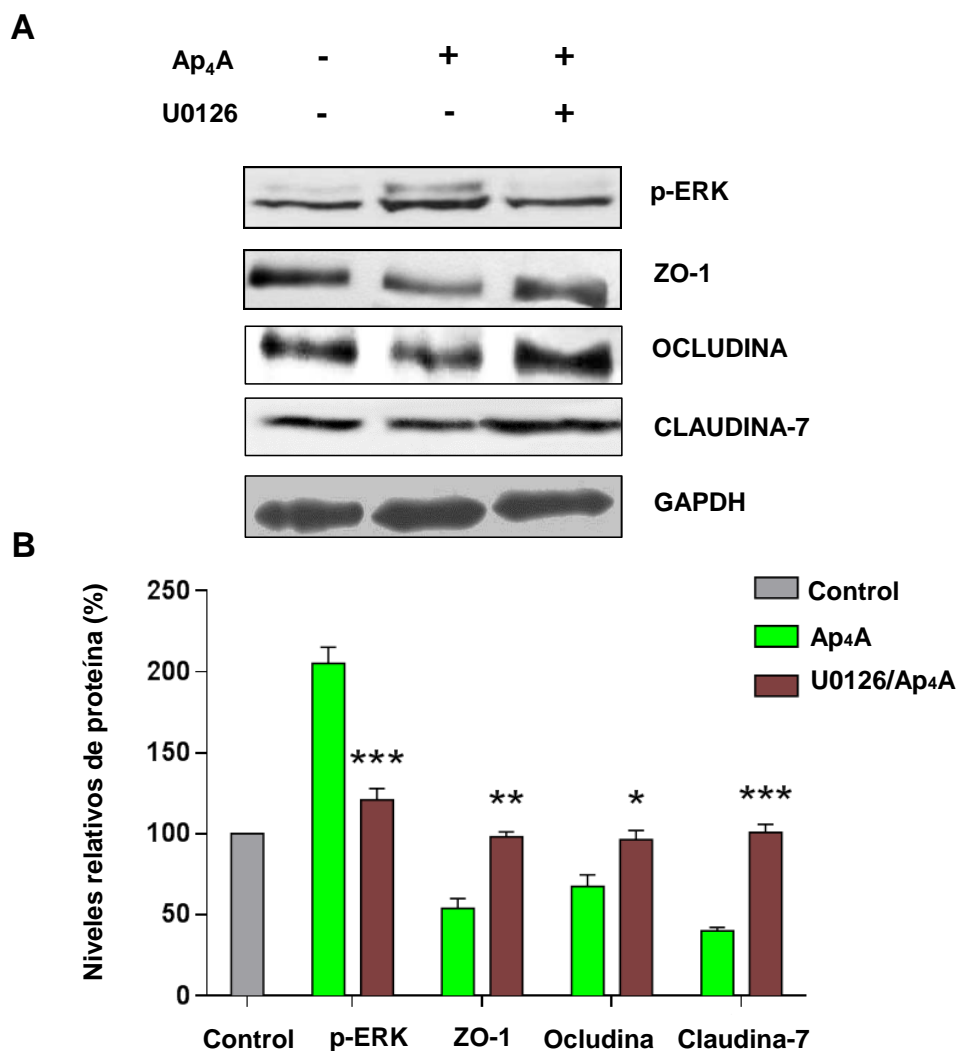


Figura 36. Implicación de la vía de señalización ERK 1/2 en el efecto de Ap₄A sobre los niveles de proteínas constituyentes de las TJ en células HCLE. (A) Imagen representativa del análisis por Western Blot que muestra los efectos de Ap₄A (100 μ M) y el inhibidor de MEK U0126 (100 μ M) sobre la activación de ERK 1/2 y los niveles proteicos de ZO-1, ocludina y claudina-7 en células HCLE. (B) Cuantificación relativa de las intensidades de banda del Western Blot. La señal de Western Blot se cuantificó por análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos respecto al control. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente a los correspondientes tratamientos de Ap₄A solo).

Tras la preincubación de las células con el inhibidor U0126 (100 μ M) (n=4, Figura 36) se revirtió el efecto producido por Ap_4A en la activación de ERK 1/2, desapareciendo también su acción sobre los niveles proteicos de ZO-1, ocludina y claudina-7, mostrando las células pre-tratadas con U0126 niveles de dichas proteínas comparables a los de las células control. Estos resultados confirman el papel de la vía ERK1/2 en la reducción inducida por Ap_4A sobre los niveles de las tres proteínas, las cuales son clave en el mantenimiento de la función de barrera del epitelio corneal.

4. Ensayos de inmunocitoquímica para evaluar el efecto de Ap_4A y UTP sobre la localización de ZO-1 en células HCLE

Se realizaron estudios de inmunocitoquímica en células HCLE para detectar la presencia de ZO-1 con el fin de ver si los tratamientos con Ap_4A y UTP inducían cambios en la localización de ZO-1.

Como se puede observar en la Figura 37, en el caso de las células control todas las membranas celulares presentaron la localización típica de ZO-1, mostrando un patrón de tinción en los bordes de las células HCLE a modo de línea continua a lo largo de las regiones de contacto célula-célula, marcaje típico de las TJ del epitelio (Yi *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2003) (Figura 37, paneles superiores). En el caso de las células tratadas con Ap_4A y UTP, se apreció una clara pérdida del marcaje en esta localización, mostrando una tinción más difusa y de menor intensidad tras la aplicación de ambos nucleótidos (en los paneles centrales e inferiores, respectivamente).

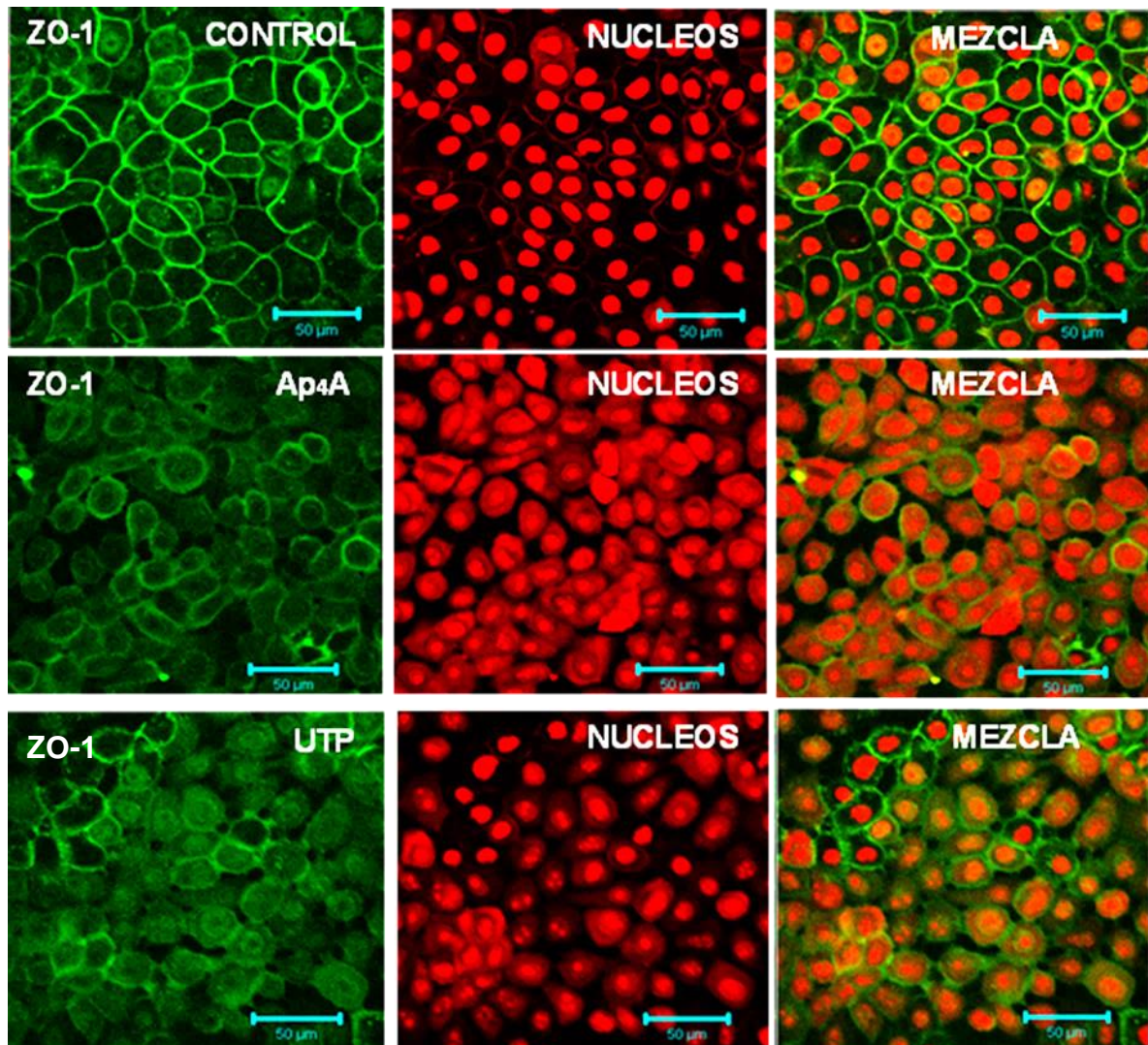


Figura 37. Inmunolocalización de la proteína ZO-1 tras la aplicación de Ap₄A (100 μM) y UTP (100 μM) en las células HCLE. El análisis inmunocitoquímico de ZO-1 en las células control (paneles superiores), tratadas con Ap₄A (paneles medios) y con UTP (paneles inferiores), se realizó 2 h después de la aplicación del agente correspondiente. ZO-1 está marcado en verde mientras que los núcleos aparecen teñidos con yoduro de propidio (rojo). Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes. Las barras de escala corresponden a 50 μm.

5. Ensayos de viabilidad celular

Con el fin de evaluar si el tratamiento con Ap₄A en células HCLE puede producir algún efecto citotóxico, se incubaron las células de epitelio corneal con el dinucleótido durante 24 h y se realizaron ensayos de viabilidad celular basados en el metabolismo

del MTT (3-(4, 5 Dimetil-2-tiazolil)-2,-2H-tetrazolio 5-difenil bromuro). Mientras el tratamiento con Ap_4A (100 μM) es capaz de modificar la permeabilidad de la barrera corneal como revelaron los estudios del TEER, la exposición al dinucleótido durante 24 h no indujo cambios significativos en la viabilidad celular (Figura 38).

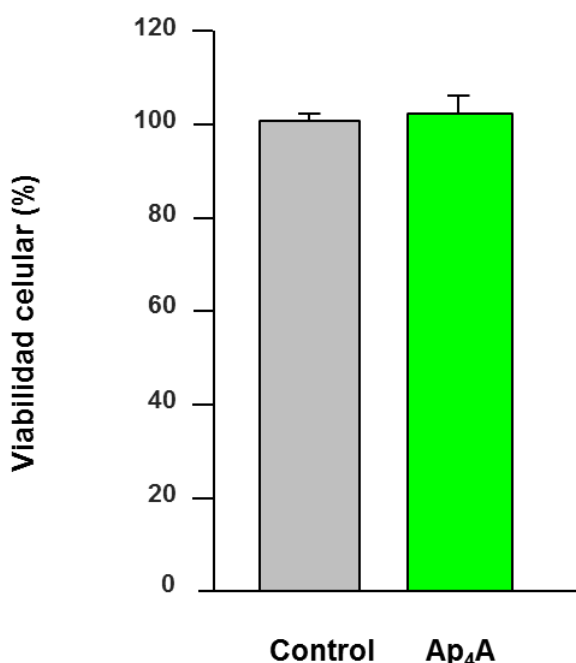


Figura 38. Efecto en la viabilidad celular de Ap_4A en células HCLE. Dicha viabilidad celular se determinó con el ensayo MTT y los datos se normalizaron respecto al valor control (100%). Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

6. Ensayos de espectrofotometría para evaluar la entrada de compuestos de diferente peso molecular a través de células HCLE

En primer lugar, mediante ensayos de espectrofotometría, se establecieron las condiciones de tiempo para que se produjese la situación de equilibrio en los valores de absorbancia de tres colorantes (todos a concentración 1 mM) con diferentes pesos moleculares (hematoxilina, 302.28 g/mol; azul de bromofenol, 669.96 g/mol, y azul de Evans, 960.81 g/mol), en filtros *transwell* donde no se sembraron células.

Por otra parte, una vez sembradas las células HCLE en filtros *transwell* de policarbonato y, tras el tratamiento previo con Ap_4A (100 μM) descrito en Materiales y

Métodos y la posterior aplicación de los diferentes colorantes, se procedió a leer los valores de absorbancia en dichos *transwell*.

Los colorantes hematoxilina y azul de Evans alcanzaron la estabilidad en los valores de absorbancia en las medidas realizadas a tiempos cortos, mientras que, en el caso del azul de bromofenol, se alcanzó la estabilidad entre los 60 y 80 minutos, aproximadamente (Figura 39 A).

En el caso del colorante hematoxilina (cuyo peso molecular es de 302.28 g/mol) (Figura 39 A), al medir la absorbancia se puede observar que presenta valores prácticamente iguales a los obtenidos en el tratamiento control, lo que indica que, dado su pequeño tamaño, la facilidad de entrada es igual en presencia o en ausencia del tratamiento con el dinucleótido.

En la Figura 39 B, se aprecia cómo los valores de absorbancia del colorante azul de bromofenol, de peso molecular 669.96 g/mol en células tratadas con Ap_4A son mayores con respecto a los valores control, lo que indica que Ap_4A favorece la entrada de dicho compuesto en la monocapa de células corneales epiteliales.

Por el contrario, el colorante azul de Evans (de peso molecular 960.81 g/mol), tiene un comportamiento muy diferente a los otros dos colorantes, presentando valores de absorbancia muy bajos y con muchas oscilaciones, lo cual sugiere que dicho compuesto, al ser el de peso molecular más elevado de los tres, no es capaz de atravesar la barrera corneal, tanto en presencia como en ausencia de Ap_4A (Figura 39 C).

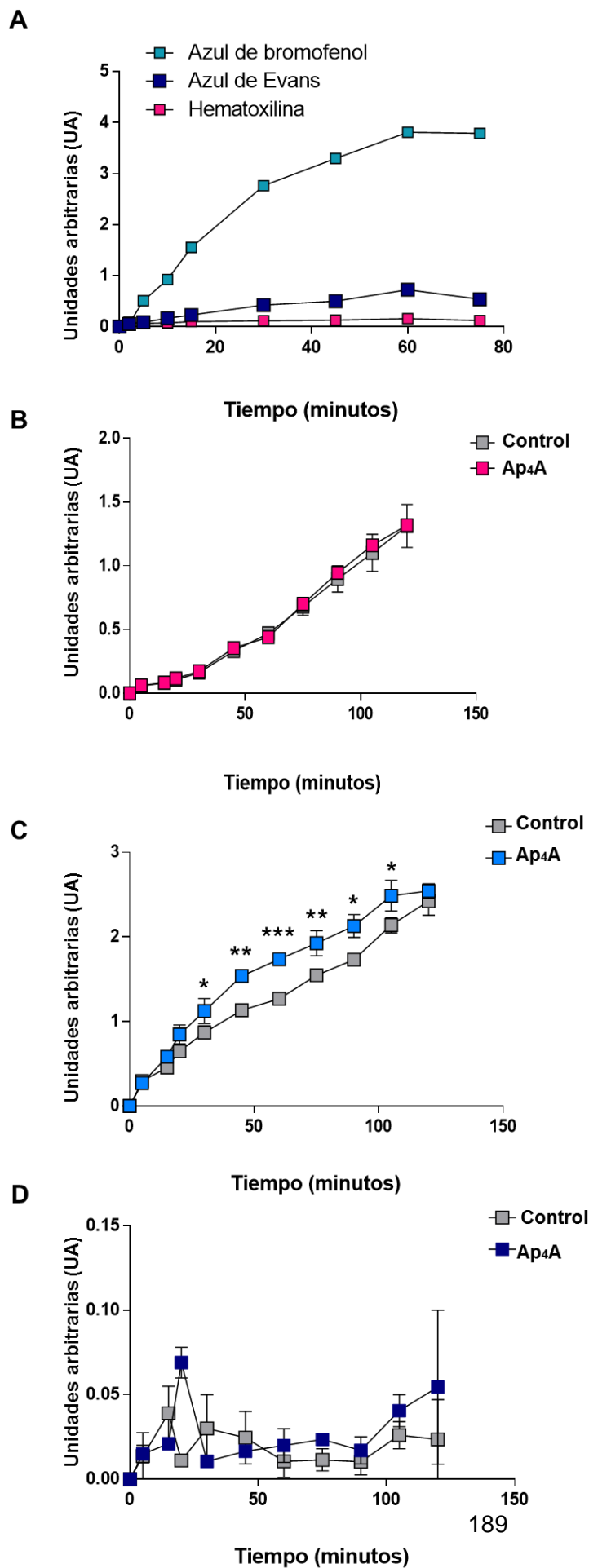


Figura 39. Efecto de Ap₄A (100 μM) sobre la entrada de compuestos de diferente peso molecular a través de células HCLE. (A) Ensayos de espectrofotometría en ausencia de células para determinar los tiempos de equilibrio de las concentraciones de tres colorantes con diferentes pesos moleculares. Los valores mostrados corresponden a la media ± S.D. de tres experimentos independientes. (B) Hematoxilina (1mM); (C) Azul de bromofenol (1mM) y (D) azul de Evans (1mM). Las medidas de absorbancia se tomaron a intervalos de cinco minutos durante un tiempo máximo de 2 h. Los valores mostrados corresponden a la media ± S.D. de tres experimentos independientes (* p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 frente a los valores control sin el dinucleótido Ap₄A).

7. Efecto in vivo del Ap₄A en el modelo de conejo albino de Nueva Zelanda

7.1. Preparaciones montadas en plano de córneas de conejos albinos de Nueva Zelanda

Para evaluar el efecto de Ap₄A en la localización de ZO-1 en el epitelio corneal de conejos albinos de Nueva Zelanda, se extrajeron las córneas de los animales y se realizaron estudios de córneas montadas en plano con el fin de comparar la localización de dicha proteína en el epitelio de córneas sin tratar y en aquellas en las que se aplicó tópicamente Ap₄A (10 µM).

Como era de esperar, en las córneas control (sin tratamiento con Ap₄A) la inmunoreactividad de ZO-1 apareció como una línea continua a lo largo de las regiones de contacto célula-célula (Figura 40).

Este patrón de tinción en las membranas celulares es característico de las TJ en células epiteliales corneales (Ryeom *et al.*, 2000). La aplicación tópica de Ap₄A (10 µM) produjo cambios en la distribución de la proteína ZO-1, detectándose la disrupción en el marcaje de ZO-1, así como una disminución de la intensidad en los bordes de las células del epitelio corneal de los conejos 2 h después del tratamiento con Ap₄A. En cambio, 24 h después del tratamiento con el dinucleótido se observó un patrón muy similar al obtenido con el control, lo que indica que se trata de un fenómeno transitorio.

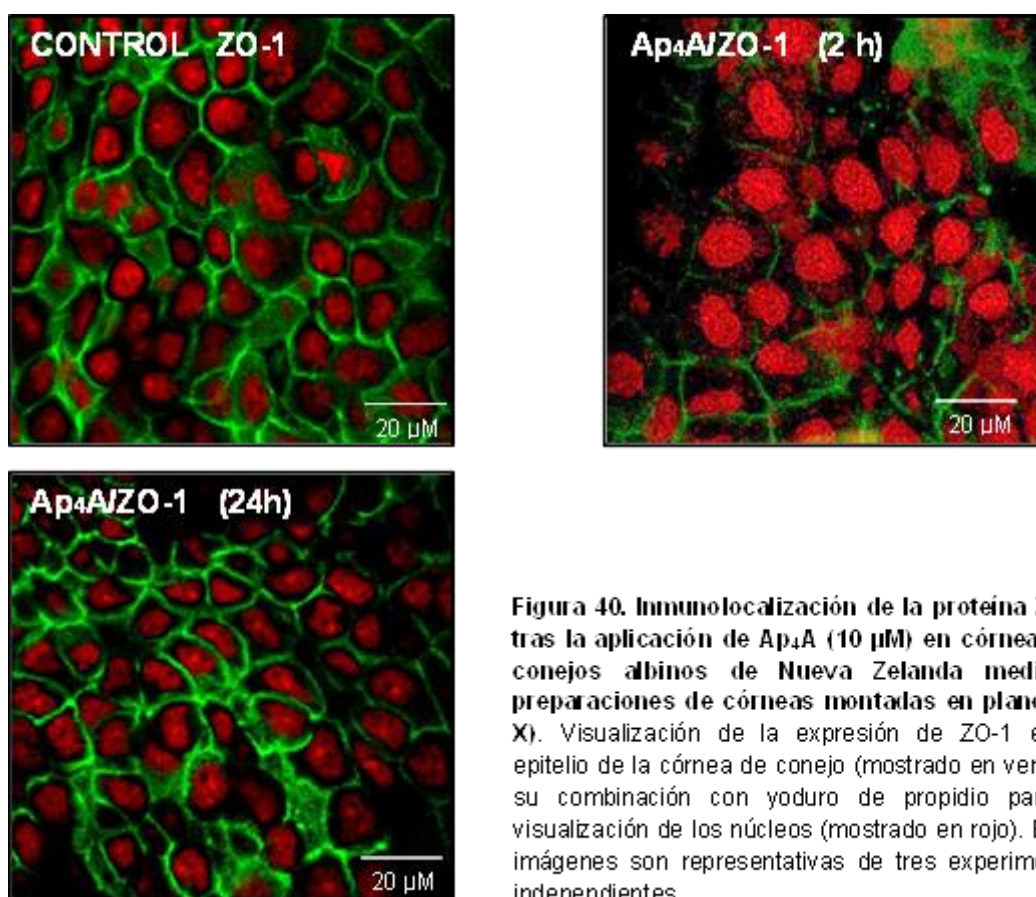


Figura 40. Immunolocalización de la proteína ZO-1 tras la aplicación de Ap₄A (10 μM) en córneas de conejos albinos de Nueva Zelanda mediante preparaciones de córneas montadas en plano (40 X). Visualización de la expresión de ZO-1 en el epitelio de la córnea de conejo (mostrado en verde) y su combinación con yoduro de propidio para la visualización de los núcleos (mostrado en rojo). Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

7.2. Cuantificación de la entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en ausencia o en presencia de Ap₄A.

Ensayos de silenciamiento del receptor P2Y₂ mediante siRNA

Con el fin de estudiar si el efecto inducido por Ap₄A en los niveles de proteínas constituyentes de las TJ podría facilitar la entrada de fármacos *in vivo*, se analizó la entrada del análogo de la melatonina 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda. Los animales fueron tratados con 5-MCA-NAT aplicado en tres condiciones diferentes: individualmente (10 mM, 10 μl), simultáneamente con Ap₄A (10 μM, 10 μl) (“Ap₄A + 5-MCA-NAT”) y 2 h después de la aplicación del dinucleótido (“Ap₄A/5-MCA-NAT”). Esta última condición fue también analizada en conejos en los que se indujo previamente el silenciamiento de los receptores P2Y₂ mediante la aplicación tópica de un siRNA frente a los mismos, tal y como se describe

en Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 41, se detectó 5-MCA-NAT en el humor acuoso de los animales tras la aplicación tópica de dicho compuesto. La concentración medida fue de 97.5 ± 5.3 nM, muy parecida a la que se obtuvo cuando Ap_4A se aplicó simultáneamente con 5-MCA-NAT (105.1 ± 8.69 nM). En cambio, cabe destacar que cuando se administró Ap_4A 2 h antes que 5-MCA-NAT, la concentración de este último en el humor acuoso fue de 314.4 ± 10.64 nM. En presencia del siRNA frente al receptor P2Y_2 , la concentración de 5-MCA-NAT fue de 109.4 ± 6.73 nM ($p < 0.001$, $n=4$).

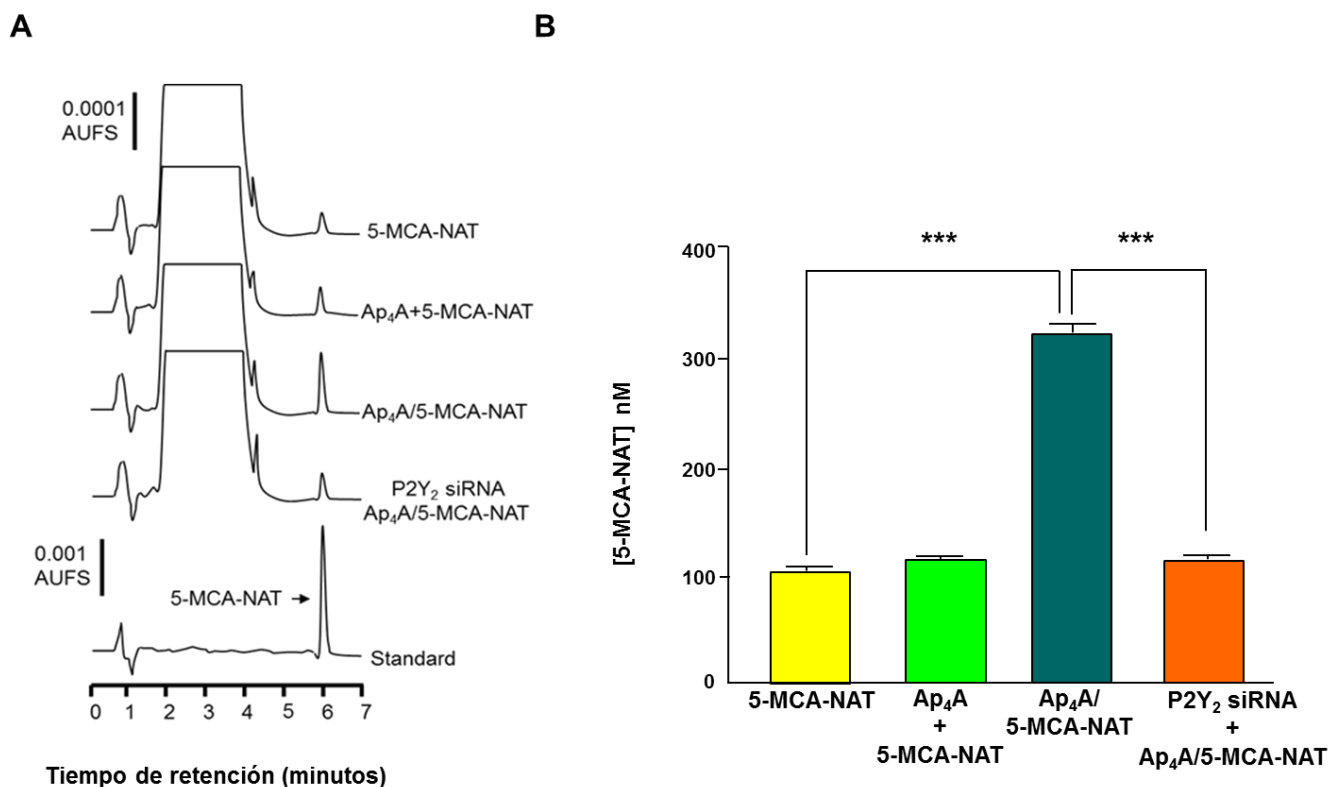
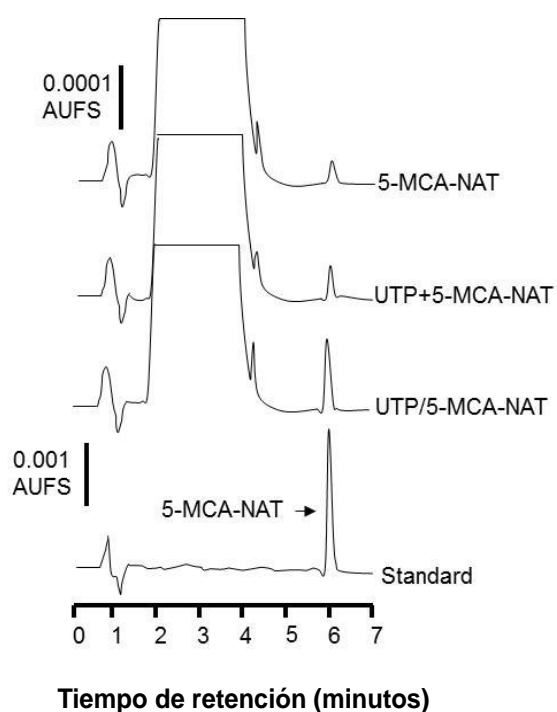


Figura 41. Entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en combinación con el dinucleótido Ap_4A y en presencia de siRNA frente a P2Y_2 . (A) Perfiles representativos de HPLC del análogo de la melatonina cuando se aplicó solo, simultáneamente con Ap_4A (" $\text{Ap}_4\text{A} + 5\text{-MCA-NAT}$ "), 2 h después de la tratamiento con el dinucleótido (" $\text{Ap}_4\text{A}/5\text{-MCA-NAT}$ ") y en presencia de siRNA frente a P2Y_2 . (B) Cuantificación de los cromatogramas que se describen en el panel (A). Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes (** $p < 0.001$).

Del mismo modo, se realizaron experimentos similares utilizando el mononucleótido UTP. Cuando UTP y 5-MCA-NAT se aplicaron simultáneamente (" $\text{UTP} + 5\text{-MCANAT}$ "), la concentración obtenida para el 5-MCA-NAT resultó ser de

110.40 ± 11.30 nM. En cambio, cuando el mononucleótido fue aplicado 2 h antes de 5-MCA-NAT, la concentración de este último ascendió hasta 306.70 ± 8.90 nM (“UTP/5-MCA-NAT”) (Figura 42).

A



B

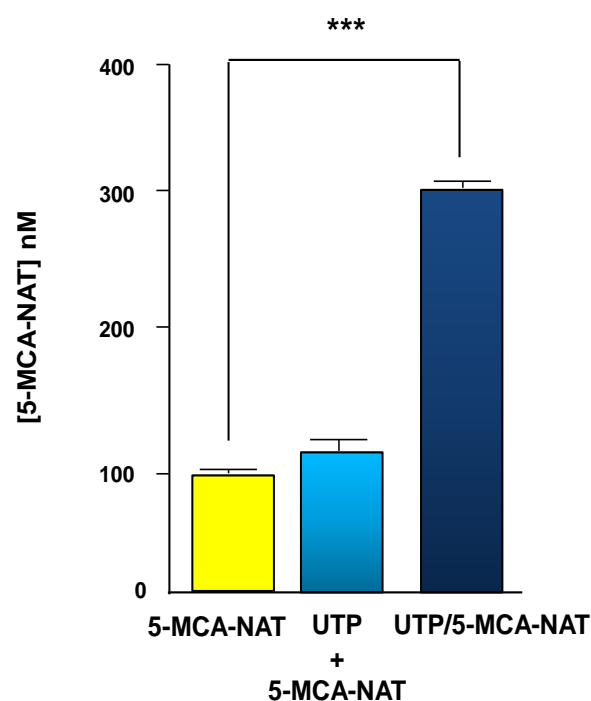


Figura 42. Entrada de 5-MCA-NAT en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en combinación con el mononucleótido UTP. (A) Perfiles representativos de HPLC del análogo de la melatonina cuando se aplicó solo, simultáneamente con UTP (“UTP + 5-MCA-NAT”) y 2 h después de la tratamiento con el mononucleótido (“UTP/5-MCA-NAT”). (B) Cuantificación de los cromatogramas que se describen en el panel (A). Los valores mostrados corresponden a la media ± S.D. de cuatro experimentos independientes (***) $p < 0.001$ frente al control con 5-MCA-NAT).

7.3. Medidas de presión intraocular en conejos albinos de Nueva Zelanda

7.3.1. Efectos de Ap_4A y 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda

Con el fin de analizar la capacidad hipotensora de los compuestos Ap_4A ($10\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{l}$) y 5-MCA-NAT ($1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{l}$) producida en conejos albinos de Nueva Zelanda, se aplicaron tópicamente dosis únicas de dichos compuestos sobre la superficie ocular de los animales ($n=8$).

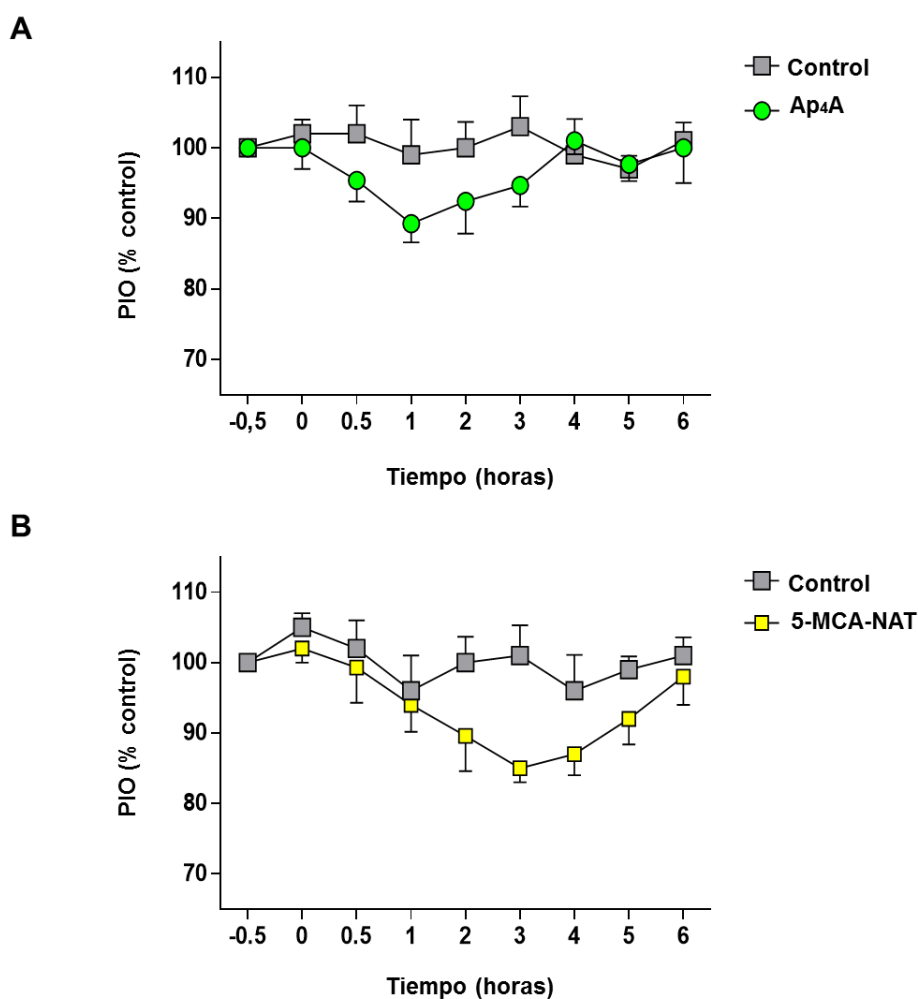


Figura 43. Efectos de Ap_4A y 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda. (A) Efecto de Ap_4A ($10\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{l}$) sobre la PIO a lo largo de 6 h. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de ocho experimentos independientes (el 100% de la PIO corresponde a $13.8 \pm 3.8\ \text{mm Hg}$). (B) Efecto de 5-MCA-NAT ($1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{l}$) sobre la PIO durante 6 h. Los valores son la media \pm desviación estándar de ocho experimentos independientes.

La reducción observada en los valores de PIO tras la aplicación de Ap_4A ($10\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{l}$) fue de $10.7 \pm 1.4\%$ en comparación con el control ($n=8$) (Figura 43A). Cuando se ensayó la capacidad del 5-MCA-NAT ($1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{l}$) para reducir la PIO en el mismo modelo animal, este compuesto indujo una reducción de $15.3 \pm 3.2\%$, en comparación con el ojo contralateral tratado con vehículo (solución salina 0.9%) (Figura 43 B).

7.3.2. Efectos combinados de Ap_4A y 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda

Una vez que la acción hipotensora de Ap_4A y 5-MCA-NAT fue analizada de forma independiente, se procedió a evaluar la aplicación de ambos compuestos combinándose de diferentes maneras, de acuerdo con los estudios efectuados en HPLC. Por un lado, se examinó su aplicación simultánea y, por otro lado, la aplicación del dinucleótido Ap_4A 2 h antes del análogo de la melatonina.

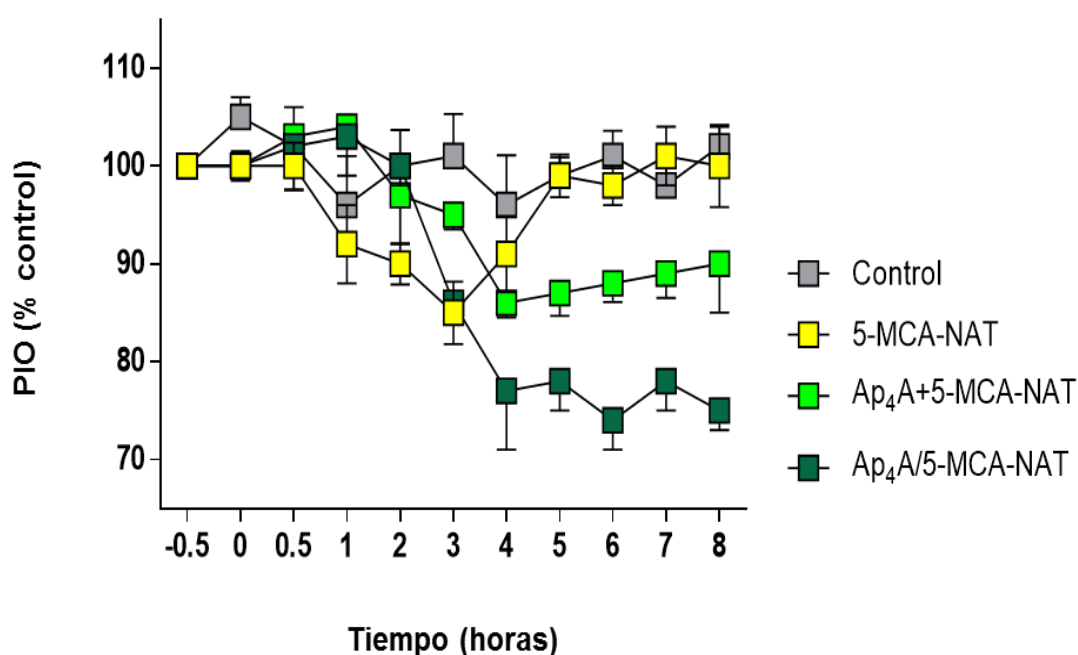


Figura 44. Efecto de 5-MCA-NAT aplicado solo y en combinación con Ap_4A sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda. Efecto de 5-MCA-NAT aplicado solo ($1\ \mu\text{M}$), combinado simultáneamente con Ap_4A ($10\ \mu\text{M}$) (" $\text{Ap}_4\text{A} + 5\text{-MCA-NAT}$ ") y aplicado 2 h después del tratamiento con Ap_4A (" $\text{Ap}_4\text{A} / 5\text{-MCA-NAT}$ ") sobre la PIO a lo largo de 8 h. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de ocho experimentos independientes (el 100% de la PIO corresponde a $14.2 \pm 3.4\ \text{mmHg}$).

La aplicación simultánea de Ap₄A y 5-MCA-NAT (10 μ M y 1 μ M, respectivamente, en un volumen de 10 μ l cada compuesto) produjo una reducción en la PIO de $14.0 \pm 2.2\%$ (n=8), y dichos valores volvieron lentamente hacia los iniciales (Figura 44). Cuando el experimento se repitió aplicando primero Ap₄A (10 μ M, 10 μ l), y 2 h después el análogo de melatonina (5-MCANAT (1 μ M, 10 μ l)), fue posible observar una reducción de la PIO de $23.5 \pm 3.6\%$ (n=8) (en comparación con los valores control, Figura 44), con la particularidad de que, en este caso, la PIO se mantuvo con valores reducidos durante un tiempo más prolongado.

7.3.3. Curva concentración-respuesta de Ap₄A en el efecto hipotensor de 5-MCA-NAT sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda

Se analizó además la capacidad de diferentes concentraciones de Ap₄A (0.1 - 500 μ M) sobre el efecto hipotensor de 5-MCA-NAT (1 μ M, 10 μ l), generándose una curva concentración-respuesta.

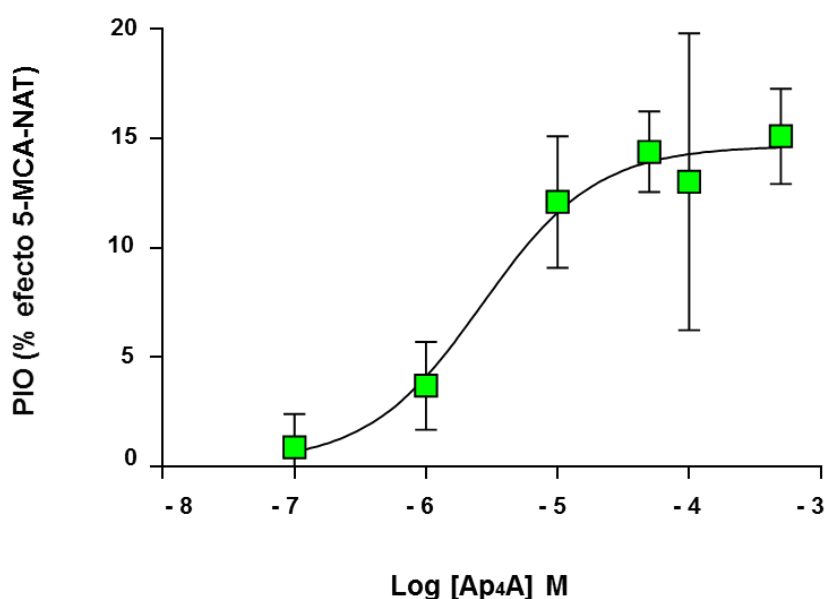


Figura 45. Curva de concentración-respuesta para Ap₄A (0.1 a 500 μ M) y 5-MCA-NAT (1 μ M) aplicado 2 h después del dinucleótido sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de ocho experimentos independientes.

Como se puede observar en la Figura 45, se obtuvo una curva de respuesta sigmoideal que proporcionó un valor pD_2 de 5.58 ± 0.16 , con un valor EC_{50} de $2.6 \mu M$ ($n=8$).

7.3.4. Efecto de antagonistas de receptores P2 y de siRNA frente al receptor $P2Y_2$ sobre la acción del Ap_4A en el comportamiento hipotensor de 5-MCANAT

Con el fin de averiguar si antagonistas de receptores P2 podían revertir el efecto que el Ap_4A producía sobre 5-MCA-NAT, se ensayaron algunos de dichos antagonistas (RB2, Suramina y PPADS) a dosis únicas de $100 \mu M$ ($10 \mu l$).

Como se puede observar en la Figura 46, RB2 y suramina fueron inhibidores más eficaces que PPADS en la potenciación por Ap_4A del efecto hipotensor de 5-MCA-NAT. RB-2 abolió el efecto de Ap_4A un $11.4 \pm 5.28\%$, mientras que el efecto de suramina fue de $11.5 \pm 0.14\%$ respecto al valor de $Ap_4A/5-MCA-NAT$. PPADS, por otro lado, redujo el efecto de Ap_4A un $5.38 \pm 3.46\%$ en comparación con la acción hipotensora de 5-MCA-NAT después de su tratamiento con Ap_4A $10 \mu M$ ($n=8$, Figura 46).

Con el objetivo de analizar con más profundidad la implicación de receptores $P2Y_2$, se procedió a investigar su silenciamiento mediante el uso de un siRNA. La aplicación de dicho siRNA revirtió la potenciación de Ap_4A en el efecto hipotensor de 5-MCA-NAT, confirmando la implicación de los receptores $P2Y_2$ en el efecto inducido por el dinucleótido.

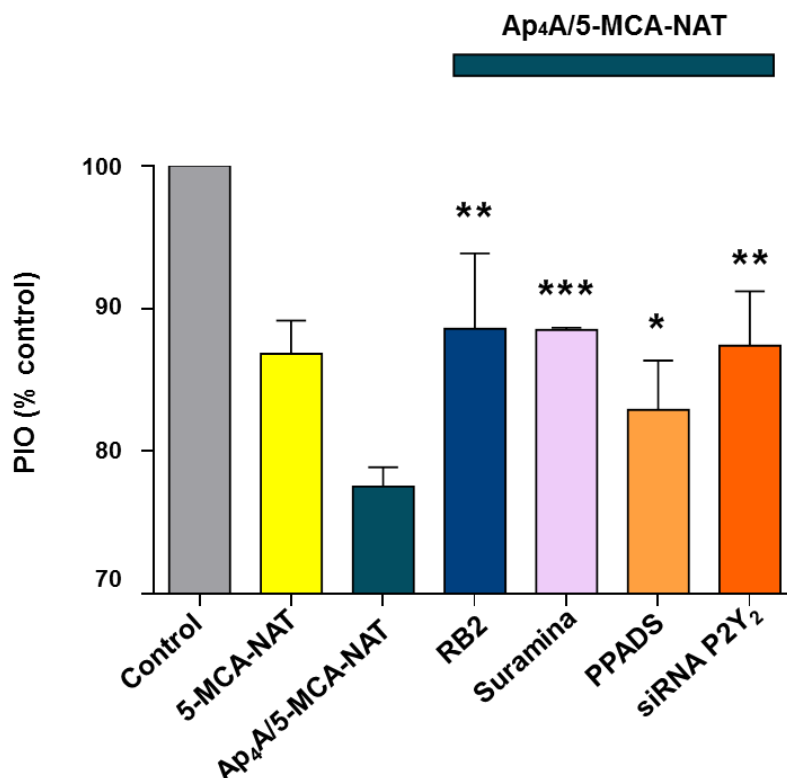


Figura 46. Efecto de antagonistas de los receptores P2 y siRNA frente a P2Y₂ en el efecto potenciador de Ap₄A sobre la acción hipotensora inducida por 5-MCA-NAT. Efecto de 5-MCA-NAT (1 μ M) aplicado solo; 5-MCA-NAT (1 μ M) aplicado 2 h después del tratamiento con Ap₄A (10 μ M) ("Ap₄A/5-MCA-NAT") en ausencia o en presencia de antagonistas de receptores P2 (RB2, suramina y PPADS, cada uno de ellos a 100 μ M, 10 μ l) y con la aplicación de un siRNA para P2Y₂. Los antagonistas de los receptores P2 se administraron 30 minutos antes de la aplicación de Ap₄A. En el caso del siRNA para P2Y₂, se aplicó una dosis única durante cuatro días consecutivos (10 nmol de siRNA resuspendidos en agua RNasa–DNasa-free, 40 μ l/día) antes de la aplicación de Ap₄A. El 100% de la PIO corresponde a 14.4 ± 3.1 mmHg. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de ocho experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente al valor de Ap₄A/5-MCA-NAT).

7.4. Cuantificación de la entrada de agentes adrenérgicos antiglaucomatosos en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en ausencia o en presencia de Ap₄A

Con el fin de estudiar si el efecto temporal inducido por Ap₄A en los niveles y funcionalidad de las proteínas constituyentes de las proteínas integrantes de las TJ podría facilitar el acceso de otros fármacos *in vivo*, se examinó la entrada de fármacos frecuentemente prescritos para el tratamiento del glaucoma (como son la brimonidina y timolol) en el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda.

Como se puede observar en la Figura 47, mediante HPLC se detectó la presencia de brimonidina en el humor acuoso de los animales ($n=4$). La cantidad medida fue de 64.3 ± 5.3 nM, que era menor que la obtenida cuando Ap_4A se aplicó simultáneamente con el fármaco (125 ± 4 nM). Por otra parte, los resultados obtenidos cuando Ap_4A se aplicó 2 horas antes de brimonidina, mostraron que la concentración de esta última resultó ser de 240.6 ± 8.6 nM.

Cuando se realizó el mismo experimento con timolol, la concentración de este β -bloqueante en el humor acuoso al aplicarse solo fue de 58.9 ± 9.2 nM. Tras su aplicación simultánea con Ap_4A se obtuvo una concentración intraocular de timolol de 88.4 ± 3.2 nM, y, tras el pretratamiento con Ap_4A , se obtuvieron valores de 183.7 ± 6.8 nM ($n=4$, Figura 48).

Estos resultados claramente confirman que el Ap_4A , al aplicarse 2 h antes, facilita que se produzca una mayor entrada de agentes antiglaucomatosos en el interior del ojo.

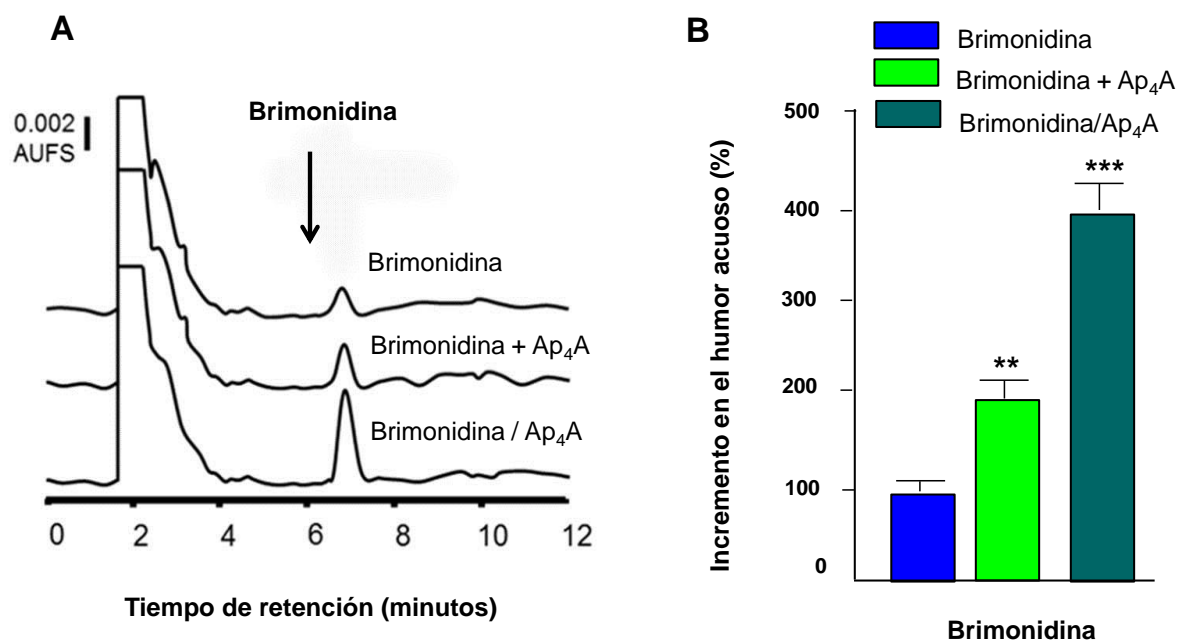


Figura 47. Entrada de agentes adrenérgicos (brimonidina) en combinación con Ap₄A sobre el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda. (A) Perfiles representativos de HPLC de brimonidina cuando se aplica sola (trazo superior), simultáneamente con Ap₄A (trazo medio), y 2 h después de la instilación del dinucleótido (trazo inferior). (B) Porcentaje de aumento en la presencia de brimonidina aplicada sola (azul), simultáneamente con Ap₄A (verde claro) y 2 h después de la aplicación de Ap₄A (verde oscuro) (** p < 0.01, *** p < 0.001 frente al compuesto solo).

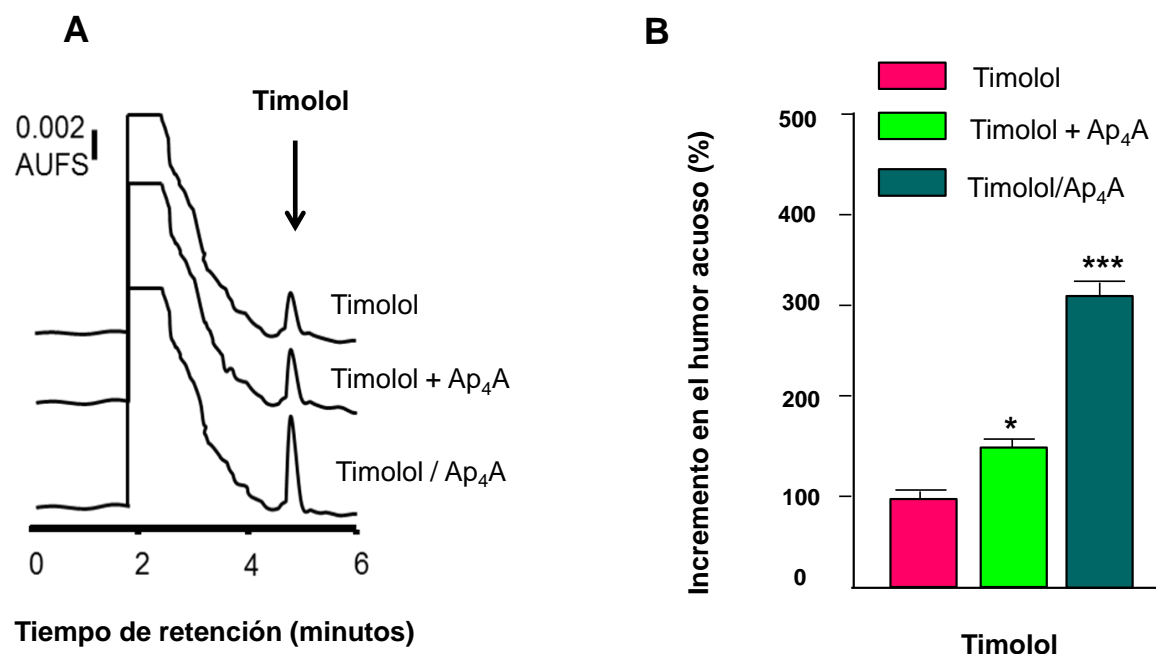


Figura 48. Efecto de agentes adrenérgicos (timolol) en combinación con Ap₄A sobre el humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda. (A) Perfiles representativos de HPLC de timolol cuando se aplica solo (trazo superior), simultáneamente con Ap₄A (trazo medio), y 2 h después de la instilación del dinucleótido. (B) Porcentaje de aumento en la presencia de timolol aplicado solo (rosa), simultáneamente con Ap₄A (verde claro) y 2 h después de la aplicación del dinucleótido (verde oscuro) (* p < 0.05, *** p < 0.001 frente al compuesto solo).

7.5. Efectos combinados de Ap₄A y agentes adrenérgicos sobre la presión intraocular en conejos albinos de Nueva Zelanda

Junto al estudio del papel del Ap₄A sobre el efecto hipotensor del análogo de la melatonina, 5-MCA-NAT, se investigó además si el pretratamiento con Ap₄A (10 µl, 10 µM) es también capaz de modificar la acción hipotensora de fármacos prescritos en el tratamiento del glaucoma. Con este fin, se aplicaron tópicamente sobre los ojos de los conejos albinos de Nueva Zelanda los agentes adrenérgicos brimonidina y timolol de tres formas diferentes: individualmente, combinados simultáneamente con Ap₄A (“Agente adrenérgico + Ap₄A”) y 2 h después de la aplicación del dinucleótido (“Agente adrenérgico/Ap₄A”).

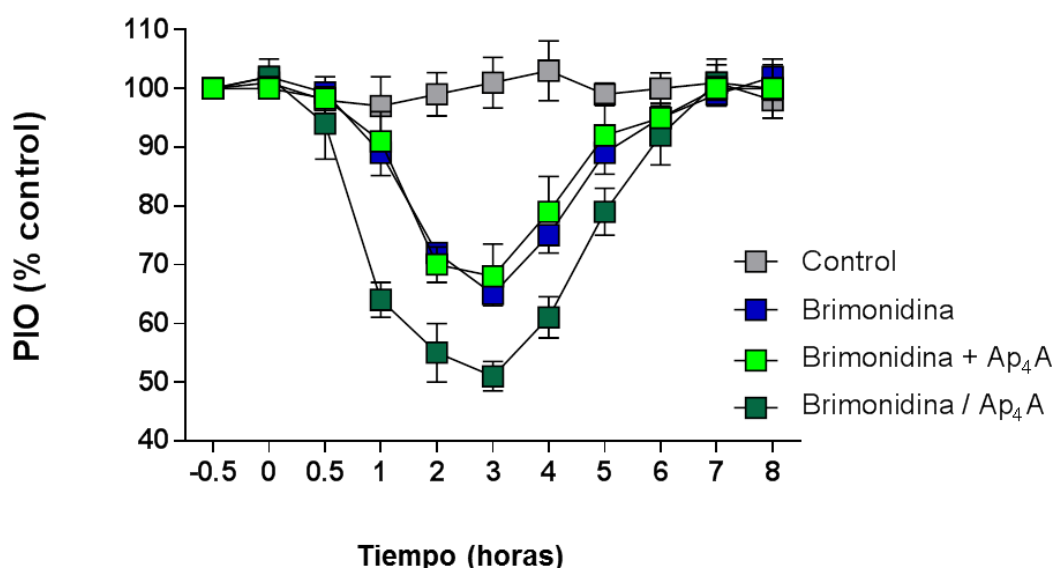


Figura 49. Efecto de agentes adrenérgicos (brimonidina) en combinación con Ap₄A sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda. Se muestra la evolución en el tiempo de los cambios en la PIO producidos tras la aplicación de brimonidina individualmente (cuadrados azules), simultáneamente con Ap₄A (cuadrados verdes claros), y dos horas después de la aplicación de Ap₄A (cuadrados verdes oscuros). El control (cuadrados grises) corresponde a los animales tratados sólo con vehículo (solución salina). El 100% representa la presión intraocular antes de la aplicación de cualquier fármaco (es decir, en t=0) y fue equivalente a 16.5 ± 1.7 mm Hg. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de seis experimentos independientes.

La aplicación de brimonidina de manera individual (20 μ l, 2 mg/ml) no difiere de los resultados obtenidos cuando este compuesto se aplicó simultáneamente con Ap₄A (Figura 49). Así, cuando se aplicó brimonidina de manera individual o simultáneamente con el dinucleótido (“brimonidina + Ap₄A”), la PIO se redujo de 100% (control) a $65.1 \pm 2.0\%$ (35% de reducción de la PIO). Resulta de especial interés que, cuando Ap₄A se aplicó dos horas antes que el agonista α -adrenérgico, se produjo una reducción en los valores de la PIO de un 100% (valores control) a valores de $51.0 \pm 2.5\%$ (49% de reducción) (n=6, Figura 49).

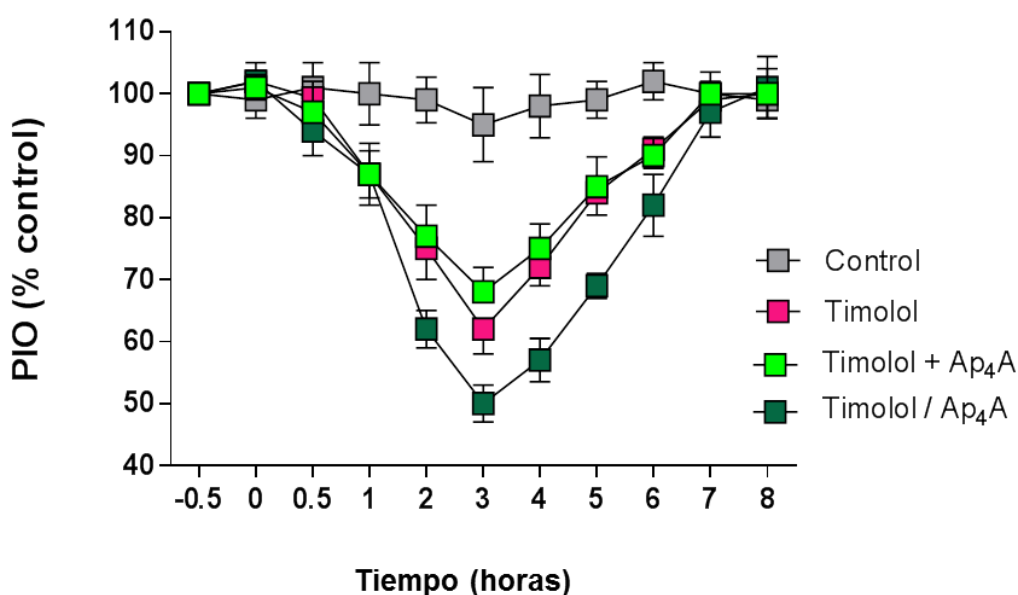


Figura 50. Efecto de agentes adrenérgicos (timolol) en combinación con Ap₄A sobre la PIO de conejos albinos de Nueva Zelanda. Se muestra la evolución en el tiempo de los cambios en la PIO producidos tras la aplicación de timolol individualmente (cuadrados rosas), simultáneamente con Ap₄A (cuadrados verdes claros), y dos horas después de la aplicación de Ap₄A (cuadrados verdes oscuros). El control (cuadrados grises) corresponde a los animales tratados sólo con vehículo (solución salina). El 100% representa la presión intraocular antes de la aplicación de cualquier fármaco (es decir, en t=0) y fue equivalente a 16.5 ± 1.7 mm Hg. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de seis experimentos independientes.

En el caso de timolol (20 μ l, 5 mg/ml), al ser aplicado de forma individual o simultáneamente con Ap₄A, produjo un efecto sobre la PIO prácticamente idéntico, proporcionando un valor de, aproximadamente, $62 \pm 4.0\%$ (38% de reducción).

Cuando Ap₄A se aplicó 2 h antes del fármaco, los valores de PIO disminuyeron desde valores control (100%) a $50.0 \pm 3.0\%$ (50% de reducción de la PIO) (n=6, Figura 50).

7.5.1. Efectos máximos obtenidos de Ap₄A y agentes adrenérgicos sobre la presión intraocular de conejos albinos de Nueva Zelanda

Se procedió a comparar los efectos máximos obtenidos cuando se utilizaron ambos agentes adrenérgicos, bien aplicados solos o combinados con Ap₄A.

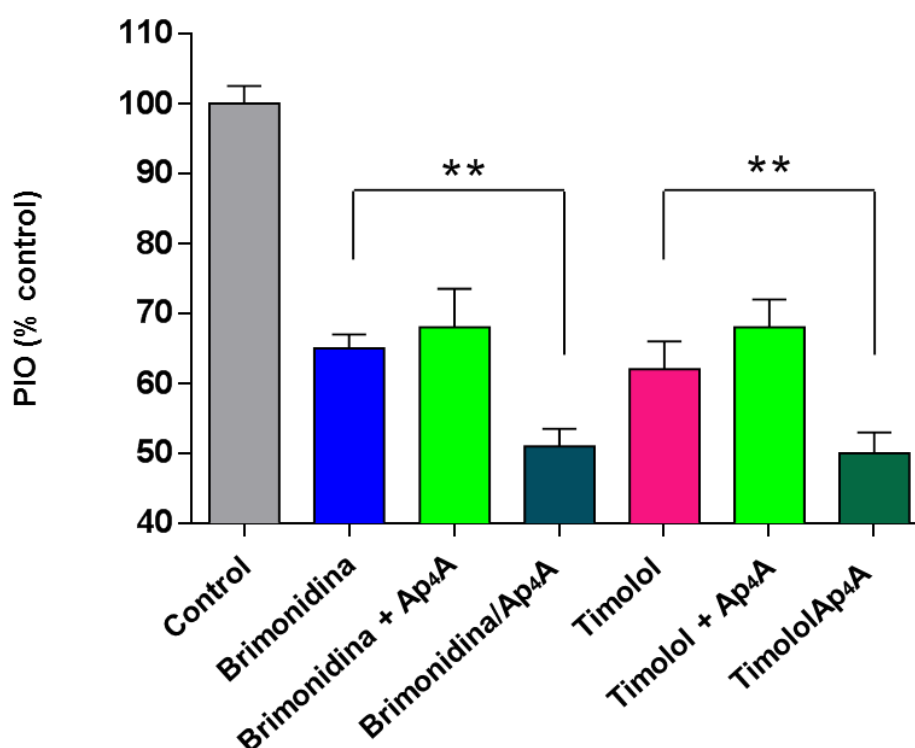


Figura 51. Comparación entre los efectos máximos obtenidos en la reducción de PIO tras la aplicación de brimonidina y timolol con o sin Ap₄A observados 3 h después de la aplicación del dinucleótido. El control (100%) representa la presión intraocular antes de la aplicación de cualquier fármaco (es decir, en t=0) y fue equivalente a 16.5 ± 1.7 mm Hg. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de seis experimentos independientes (** p < 0.01).

Como puede observarse en la Figura 51, tras la instilación del dinucleótido 2 h antes que brimonidina y timolol, el efecto hipotensor de ambos compuestos mejoró significativamente (Figura 51, n=6, p < 0.01).

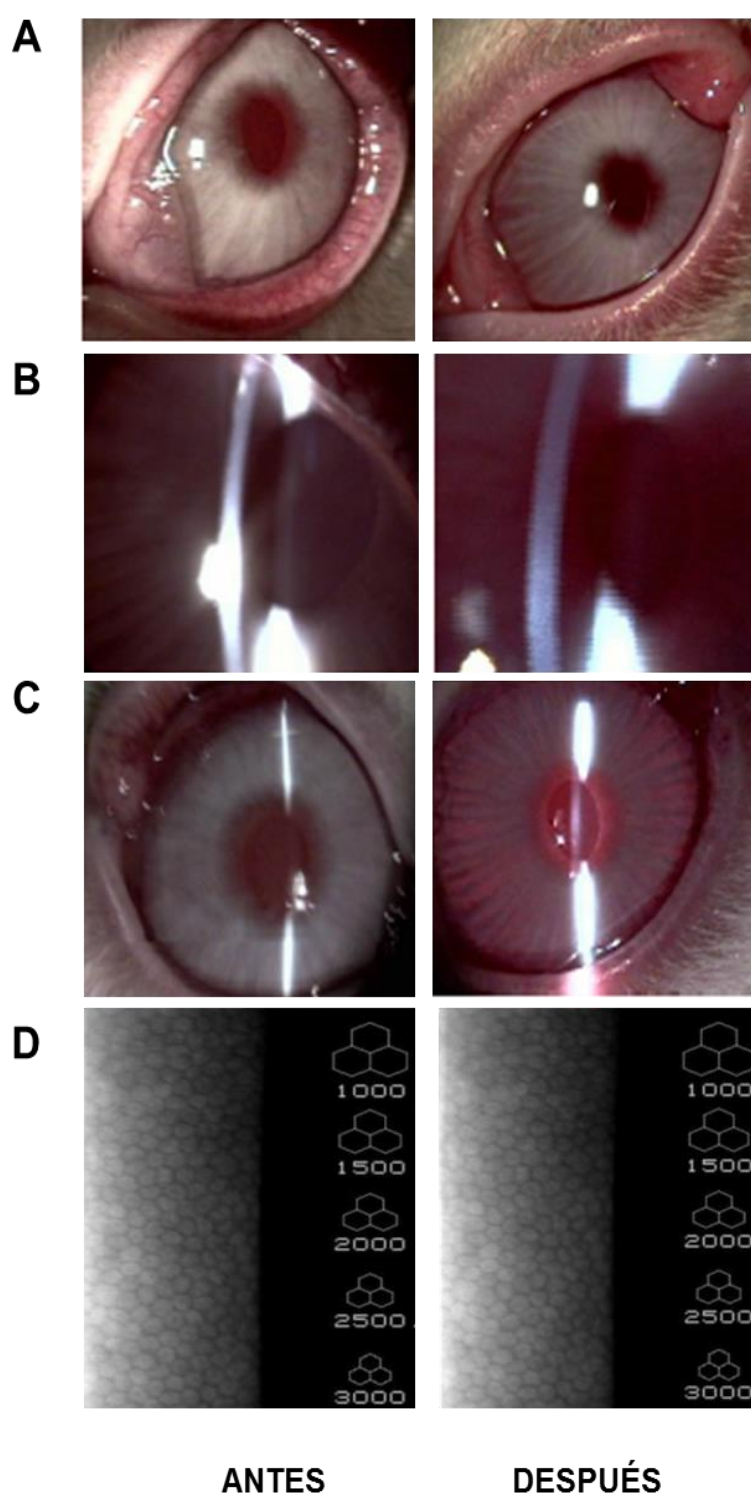
El efecto máximo producido tras la aplicación de Ap₄A 2 h antes que brimonidina y timolol produjo unas reducciones de la PIO de $51 \pm 2.5\%$ y de $50 \pm 3.0\%$ frente a los valores control (100%).

7.6. Evaluación de la salud ocular tras la aplicación tópica del Ap₄A y la instilación de compuestos adrenérgicos en el ojo de conejos albinos de Nueva Zelanda

Se evaluó el estado de salud ocular general tras la aplicación de los compuestos utilizados.

Tras la aplicación de Ap₄A y 5-MCA-NAT, no se observaron anomalías tales como enrojecimiento conjuntival y palpebral, secreciones anómalas en los párpados, edema corneal, ni opacidades en el cristalino, siendo la transparencia de los medios en todo momento satisfactoria. En cuanto a la evaluación del endotelio corneal, no se detectaron cambios en el espesor, forma y número de células (Figura 52).

Tras la aplicación de brimonidina y timolol se observó un ligero blefaroespasma, así como enrojecimiento palpebral y conjuntival, no observándose opacidades en el cristalino y en el resto de medios. En cuanto a la evaluación del endotelio corneal, no se detectaron cambios, al igual que con el resto de compuestos utilizados (Figura 52).



8. Estudio de la implicación del Ap₄A en los cambios corneales observados en un modelo de ratón glaucomatoso

El ratón DBA/2J es un modelo de glaucoma exfoliativo que presenta elevación crónica de la PIO, y una serie de características asociadas a nivel ocular. Así, como se muestra en la Figura 53, la PIO de los ratones DBA/2J se incrementó significativamente desde un estadio de 3 meses de edad a otro de 9 meses de edad. Además en el estadio de 9 meses los valores de la PIO de este ratón glaucomatoso resultan superiores a los mostrados por un ratón de la cepa control C57BL/6 del mismo estadio. Por otra parte, investigaciones realizadas en nuestro grupo indican que se produce la muerte neuronal en la retina de dicho modelo animal a partir de los doce meses de edad, haciéndose más drástica a los quince meses (Perez de Lara *et al.*, 2014).

Asimismo, en el ratón DBA/2J están descritas otra serie de características a nivel ocular. En la córnea del DBA/2J aparecen calcificaciones, edema, oclusiones, úlceras e inflamaciones corneales en ciertos estadios de edad (Sheldon *et al.*, 1995; John *et al.*, 1998; Danias *et al.*, 2003). Los depósitos corneales extracelulares, frecuentemente con aspecto globular, pueden estar asociados con adelgazamiento o úlceras por superposición del epitelio corneal (Figura 54 B, C) y con la edad se hacen más densos e incrementan su diámetro.

En el ratón DBA/2J se observa atrofia del epitelio pigmentado del iris, así como opacidades corneales, bordes pupilares más gruesos con macrófagos facocíticos, sinequias periféricas anteriores y atrofia en el cuerpo ciliar a los 6 meses de edad (Sheldon *et al.*, 1995; John *et al.*, 1998). Por otra parte, a los 8 meses de edad se producen cambios sustanciales en el espesor corneal, observándose un aumento y

asimetría del mismo en comparación con cepas control, tales como el C57BL/6 (Figura 54 A) (Chou *et al.*, 2011).

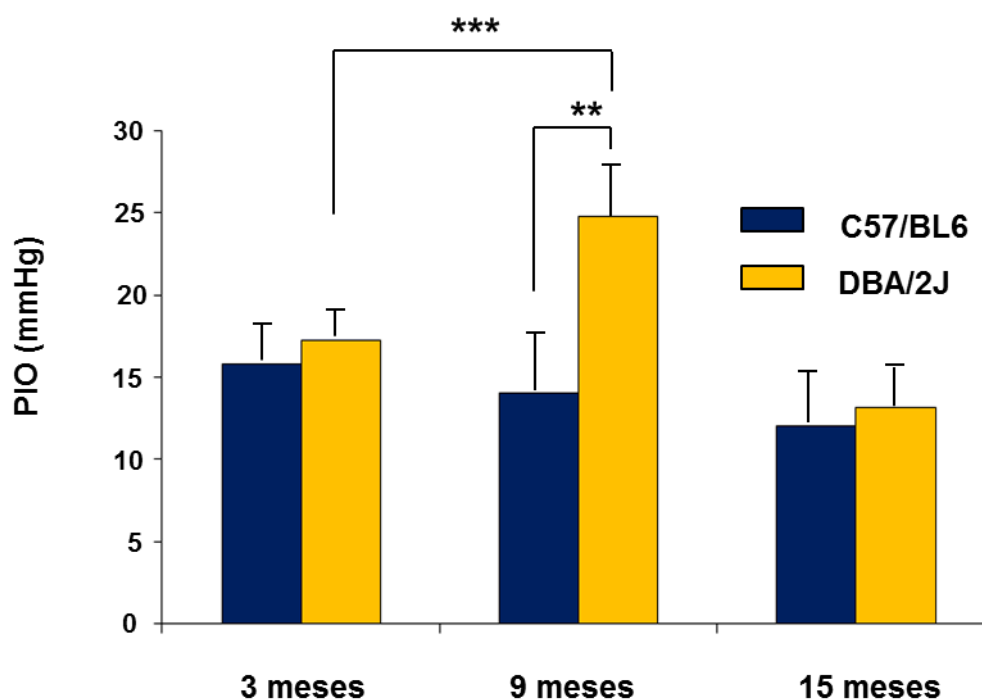


Figura 53. Medidas de presión intraocular en ratones C57BL/6 y DBA/2J, a diferentes estadios: tres meses, nueve meses y quince meses de edad. Los valores son la media \pm S.D. de ocho experimentos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Para la realización de los experimentos encaminados a estudiar la posible contribución del Ap_4A en los cambios corneales observados en el ratón DBA/2J, se empleó como modelo animal dicho ratón, así como el ratón no patológico C57BL/6. Se eligieron, a su vez, dos estadios de edad, tres y quince meses, para poder establecer comparaciones entre un estado donde aún no se ha desarrollado la patología (tres meses) y otro donde la patología está avanzada (quince meses).

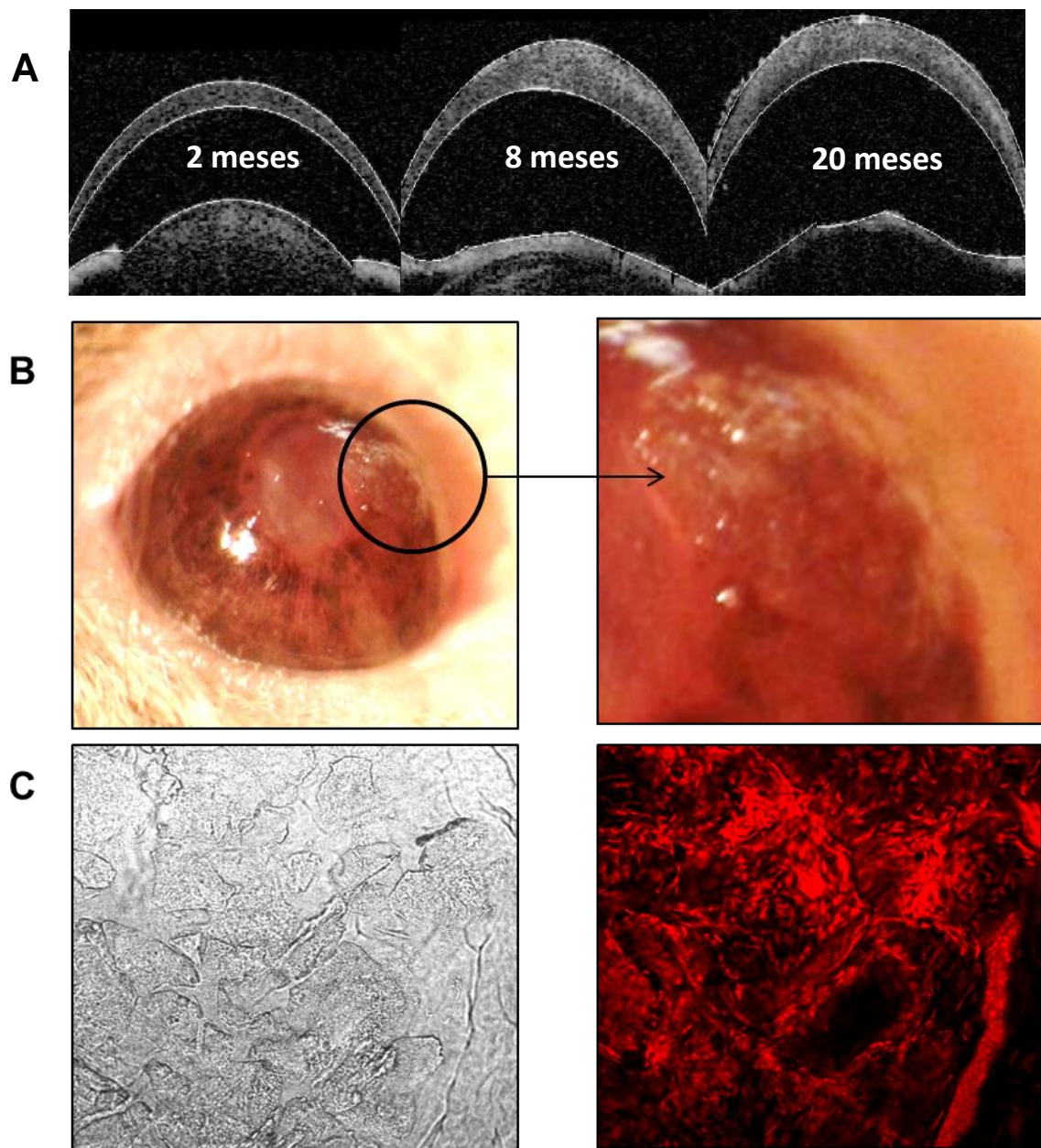


Figura 54. Alteraciones en la córnea del ratón DBA/2J. (A) Imagen adaptada (Chou *et al.*, 2011), mostrando las medidas de curvatura corneal realizadas en ratones DBA/2J a los 2, 8 y 20 meses de edad mediante OCT. A los 8 meses se puede observar la asimetría y el aumento del espesor corneal, que sigue incrementándose hasta los 20 meses. (B) Depósitos minerales en ratón DBA/2J de quince meses de edad (paneles superiores). (C) Depósitos corneales observados mediante microscopía confocal en secciones ópticas de DBA/2J de quince meses de edad (paneles inferiores). En rojo se visualizan los núcleos marcados con yoduro de propidio (20X).

8.1. Estudio comparativo a los tres y a los quince meses de edad de los niveles de Ap_4A y de ATP en el humor acuoso de ratones C57BL/6 y DBA/2J

Se midieron los niveles de Ap_4A y de ATP mediante HPLC en el humor acuoso de ratones C57BL/6 y DBA/2J a los tres y quince meses de edad ($n=3$) (Figura 55). Los niveles de ambos nucleótidos fueron claramente superiores en el estadio de mayor edad, en comparación con los resultados obtenidos en el humor acuoso de ratones de tres meses. Por ejemplo, en el caso del ratón C57BL/6, las cantidades medidas en el humor acuoso de Ap_4A y ATP a los tres meses de edad fueron de $0.52 \pm 0.08 \mu\text{M}$ y $2.69 \pm 1.22 \mu\text{M}$ frente a $7.65 \pm 1.15 \mu\text{M}$ y $8.42 \pm 0.84 \mu\text{M}$ a los quince meses. Por otra parte, en el humor acuoso de ratones DBA/2J, se observaron niveles de Ap_4A y ATP de $0.29 \pm 0.11 \mu\text{M}$ y $2.15 \pm 1.01 \mu\text{M}$ y de $12.25 \pm 6.02 \mu\text{M}$ y $15.25 \pm 1.78 \mu\text{M}$ (a los tres y quince meses de edad, respectivamente). Al comparar los valores detectados de Ap_4A y ATP en el estadio de quince meses en ambos modelos animales, se observó un aumento en la concentración de Ap_4A de $12.25 \pm 6.02 \mu\text{M}$ en ratones DBA/2J, frente a $7.65 \pm 1.15 \mu\text{M}$ en ratones C57BL/6. La concentración del mononucleótido trifosfato ATP también se incrementó en los ratones DBA/2J de quince meses ($15.25 \pm 1.78 \mu\text{M}$) frente a la que presentaron los ratones C57BL/6 de dicho estadio ($8.42 \pm 0.84 \mu\text{M}$).

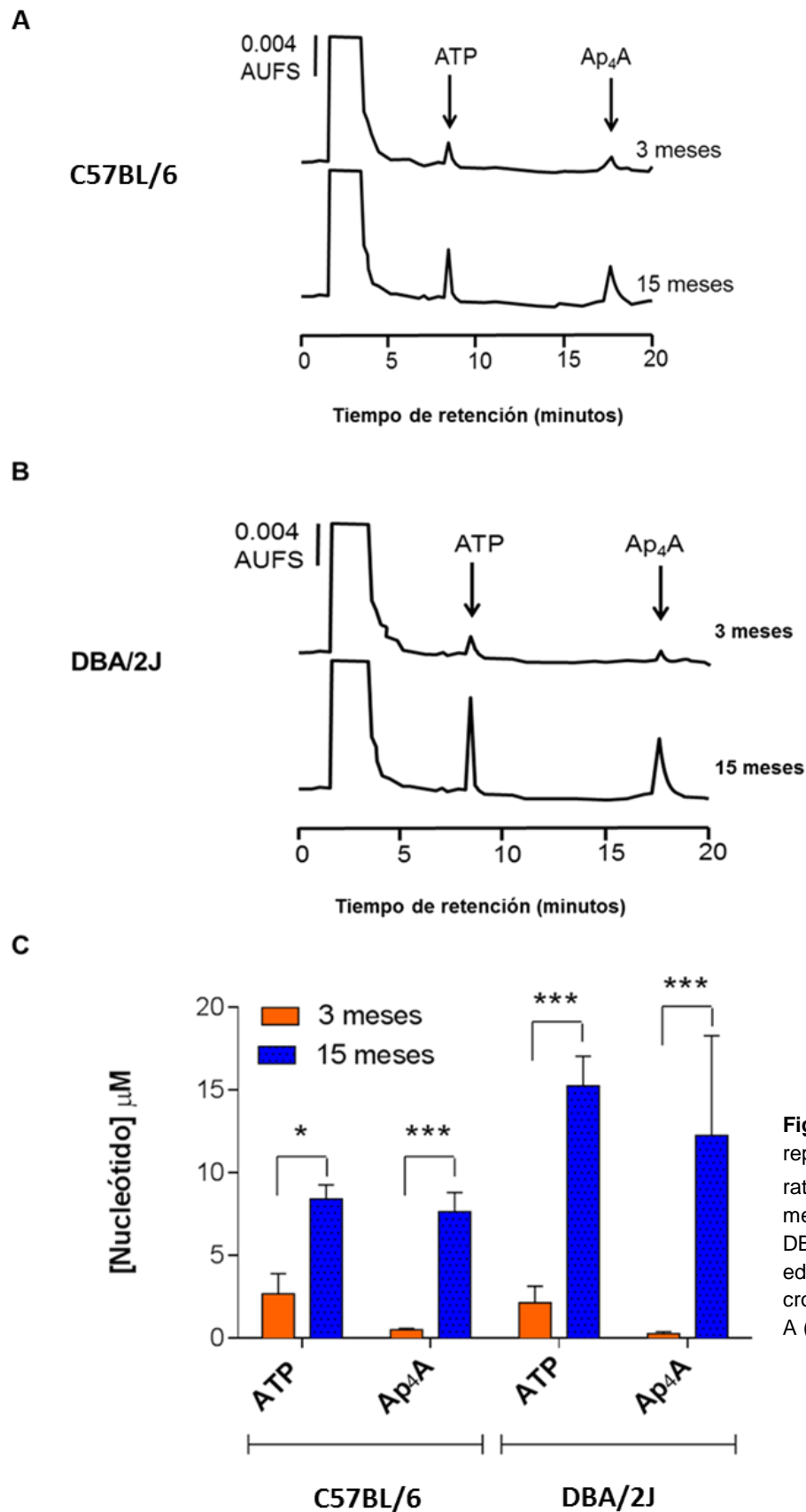


Figura 55. (A) Perfiles de HPLC representativos de ATP y de Ap₄A en ratones C57BL/6 de tres y quince meses de edad y (B) en ratones DBA/2J de tres y quince meses de edad. (C) Cuantificación de los cromatogramas descritos en el panel A (* p < 0.05, *** p < 0.001) (n=3).

8.2. Inmunohistoquímica corneal: secciones transversales y córneas montadas en plano

8.2.1. Inmunohistoquímica con secciones transversales de córnea en el modelo de ratón C57BL/6 para analizar la expresión de ZO-1, ocludina y claudina-7

En primer lugar, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para analizar, en secciones transversales de las córneas de ratones C57BL/6, la expresión de ZO-1, ocludina, y claudina-7. En la Figura 56 se observa que las tres proteínas se expresan en el epitelio corneal, y únicamente se observa marcaje endotelial en el caso de ZO-1.

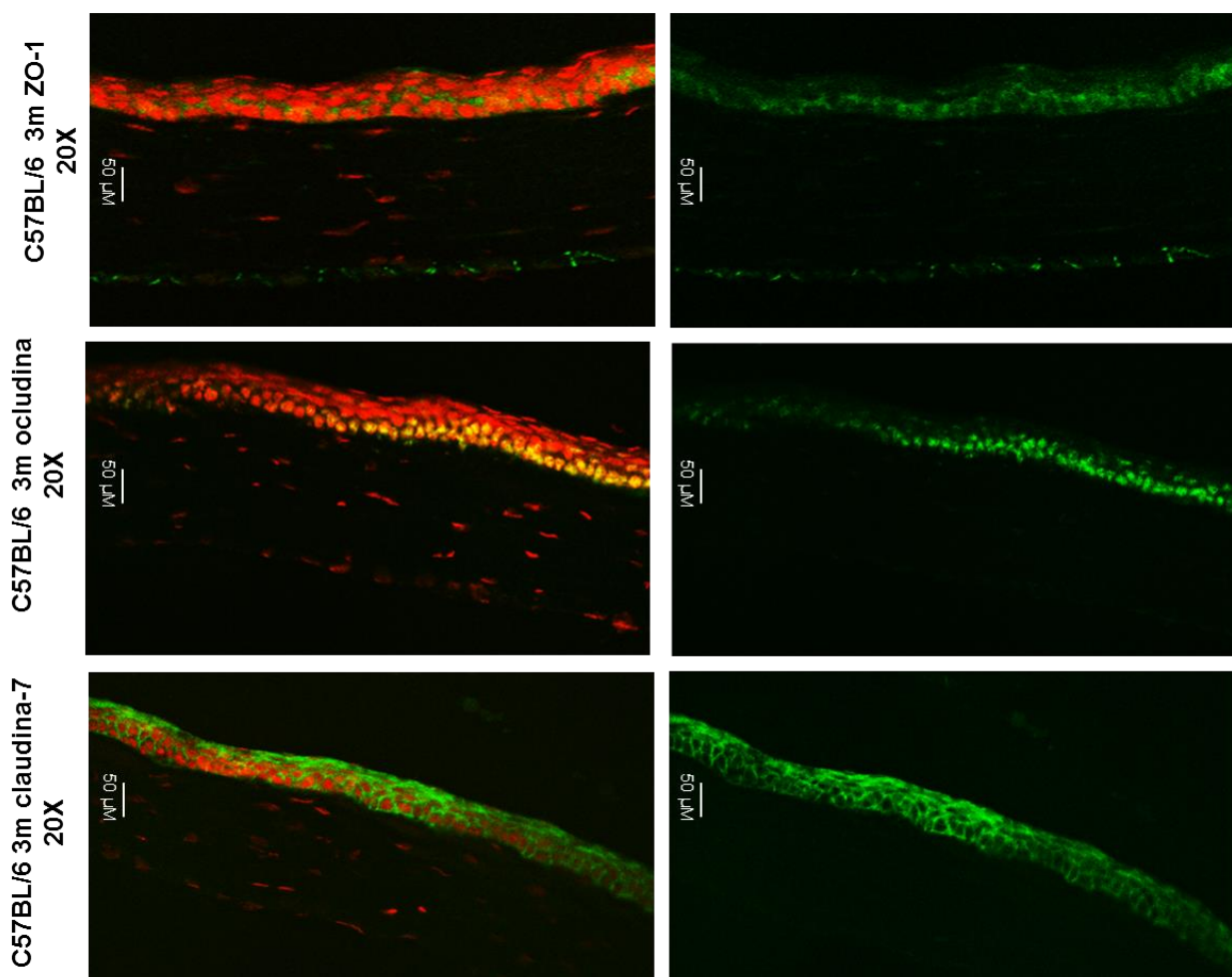


Figura 56. Inmunolocalización de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-7 en la córnea de ratones C57BL/6 de tres meses de edad. Las secciones transversales muestran la tinción correspondiente a las proteínas TJ (en verde). Los núcleos celulares se visualizan mediante yoduro de propidio (en rojo). Estas

imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Imágenes obtenidas a 20X. Las barras de escala corresponden a 50 μm .

8.2.2. Preparaciones de córneas de ratones C57BL/6 y DBA/2J montadas en plano a los tres y quince meses de edad para analizar la expresión de ZO-1 en el endotelio

Con el fin de analizar la expresión de ZO-1 (una de las proteínas clave que forman parte de las TJ) en el endotelio de ratones C57BL/6 y DBA/2J se procedió a estudiar la distribución de la misma mediante inmunohistoquímica. Teniendo en cuenta que únicamente se detectó la expresión de la proteína ZO-1 en el endotelio corneal de ratón, el estudio de los posibles cambios en las TJ endoteliales del ratón glaucomatoso DBA/2J se centró en el análisis inmunohistoquímico de dicha proteína.

En la figura 57 se presentan imágenes de preparaciones de córneas montadas en plano, mostrando la inmunoreactividad de ZO-1 en el endotelio de ratones C57BL/6 y DBA/2J a los tres meses de edad. Como puede observarse, la inmunoreactividad de ZO-1 apareció como una línea continua a lo largo de las regiones de contacto célula-célula del endotelio de ambos modelos animales, mostrando un marcaje con una intensidad muy parecida en ambos casos, y con continuidad en la tinción de ZO-1.

En la Figura 58 se presentan las imágenes de córneas montadas en plano, mostrando la inmunoreactividad de ZO-1 en el endotelio de ratones C57BL/6 y DBA/2J a los quince meses de edad. Como se observa en las imágenes de la Figura 57, existe una diferencia de intensidad en la inmunoreactividad de ZO-1 en el endotelio de los ratones DBA/2J de edad avanzada, en comparación con el ratón C57BL/6 de la misma edad. No sólo se observa una señal de ZO-1 más débil, sino que pueden apreciarse interrupciones entre las membranas de las células endoteliales.

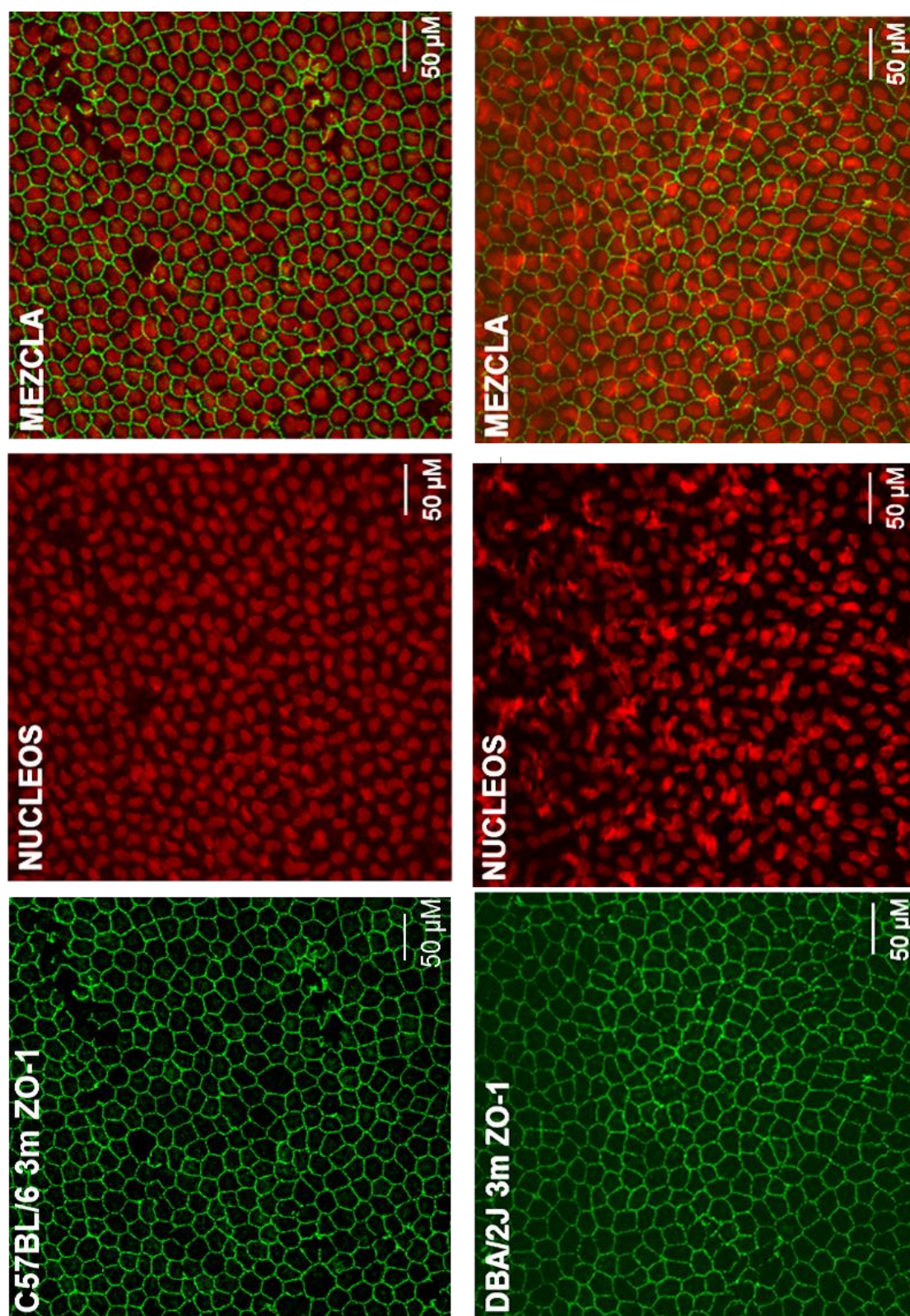


Figura 57. Inmunolocalización de ZO-1 en preparaciones de córneas montadas en plano de ratones C57BL/6 y DBA/2J de tres meses de edad. La visualización de la expresión ZO-1 (en verde) y su combinación con yoduro de propidio para mostrar los núcleos en rojo. Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Las barras de escala corresponden a 50 µm.

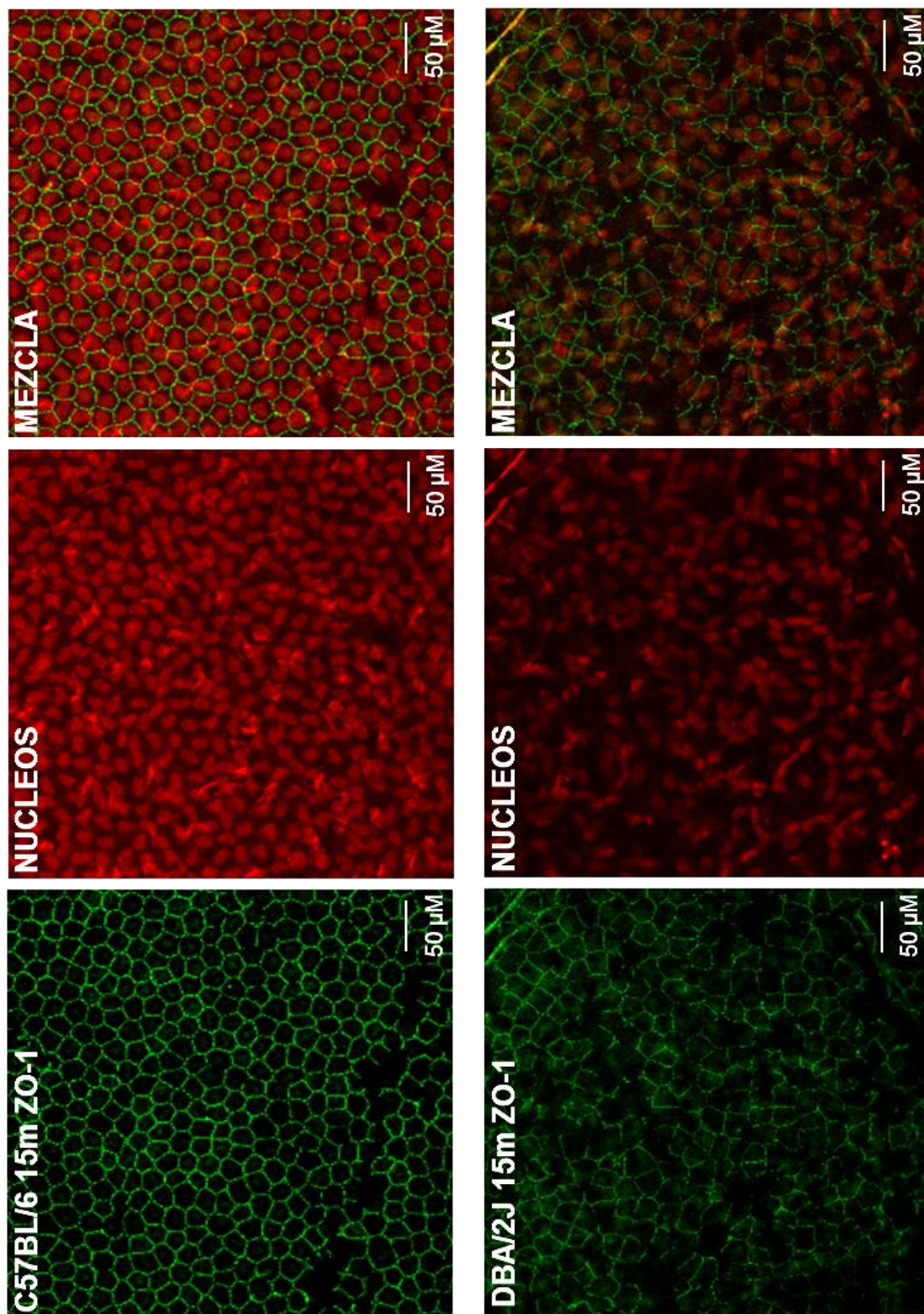
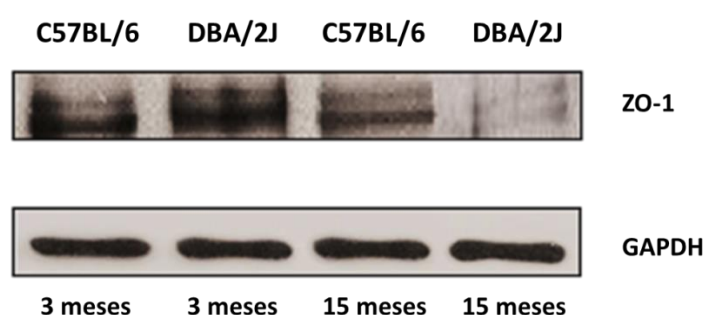


Figura 58. Inmunolocalización de ZO-1 en preparaciones de córneas montadas en plano de ratones C57BL/6 y DBA/2J de quince meses de edad. La visualización de la expresión ZO-1 (en verde) y su combinación con yoduro de propidio para mostrar los núcleos en rojo. Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Las barras de escala corresponden a 50 µm.

8.3. Estudio comparativo de los niveles proteicos de ZO-1 en córneas de ratones C57BL/6 y DBA/2J a los tres y a los quince meses de edad

Utilizando la técnica de Western Blot se cuantificaron los niveles proteicos de ZO-1 en la córnea de ratones C57BL/6 y DBA/2J, comparando los niveles de dicha proteína en ambas cepas y en dos estadios de edad diferentes (tres y quince meses).

A



B

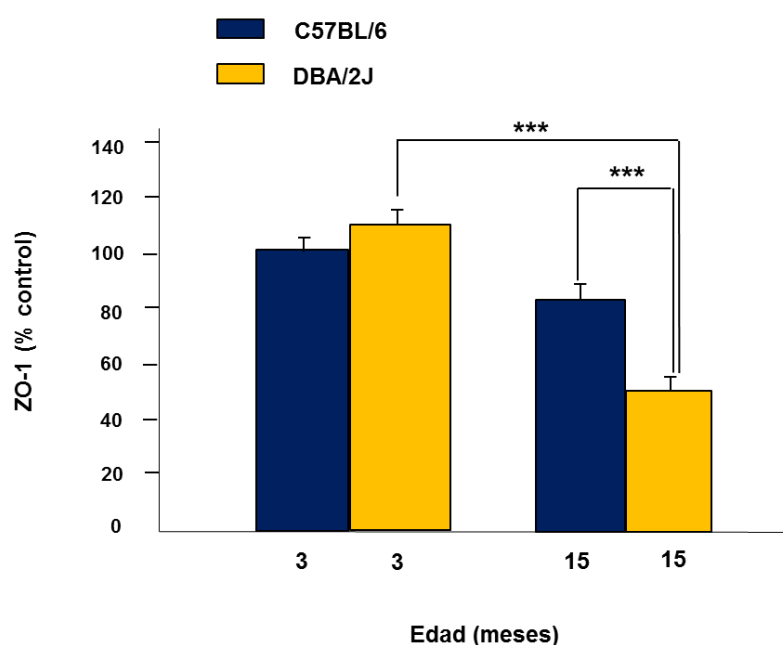


Figura 59. Cambios en los niveles de ZO-1 en la córnea de ratones C57BL/6 y DBA/2J de tres y quince meses de edad. (A) Imagen representativa del análisis por Western Blot que muestra los niveles de ZO-1 en la córnea de las cepas animales C57BL/6 y DBA/2J en dos estadios de edad diferentes (tres y quince meses). (B) Cuantificación relativa de las intensidades de banda del Western Blot. La señal de Western Blot se cuantificó por análisis densitométrico, utilizándose GAPDH como control de carga y normalizándose los datos respecto al control. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes ($p^{***} < 0.001$).

A los tres meses no se observaron cambios significativos al comparar los niveles de expresión de la proteína citoplasmática ZO-1 en ratones C57BL/6 y DBA/2J (Figura 59). En cambio, a los quince meses de edad fue posible detectar una disminución (39.6%) en los niveles de dicha proteína entre ambas cepas de ratones C57BL/6 ($82.28 \pm 0.05\%$) y DBA/2J ($49.69 \pm 0.06\%$).

Como se observa en la Figura 59, se aprecia también una disminución de los niveles proteicos de ZO-1 cuando se compara el ratón DBA/2J de tres meses de edad ($111.15 \pm 0.08\%$) y el ratón DBA/2J de quince meses de edad ($49.69 \pm 0.06\%$), reduciéndose los mismos en más de la mitad (55.3% de reducción).

Discusión

DISCUSIÓN

Esta sección consta de cuatro grandes apartados, en base a los objetivos propuestos inicialmente junto a las hipótesis de partida planteadas.

1. Papel biológico de Ap₄A en la protección de la superficie ocular

El diadenosin tetrafosfato o Ap₄A desempeña un relevante y amplio papel en el ojo, incrementando la secreción lagrimal (Pintor *et al.*, 2002a; Pintor *et al.*, 2002b), estimulando procesos de reparación de heridas corneales (Pintor *et al.*, 2004a), así como desempeñando un papel neuroprotector sobre los terminales nerviosos que inervan el cuerpo ciliar (Hoyle *et al.*, 2010). Del mismo modo, produce diferentes efectos sobre la PIO, bien aumentándola (activando receptores P2Y₂ en los procesos ciliares, (Martín-Gil.; Pintor, 2010; Martin-Gil, 2010)), o disminuyéndola mediante la activación de receptores P2Y₁ y P2X₂ en la malla trabecular y en las terminales nerviosas de los procesos ciliares, respectivamente (Pintor, 2005; Soto *et al.*, 2005).

En el ojo, la acción del Ap₄A y de otros nucleótidos se produce a través de receptores purinérgicos, cuya presencia está descrita en diversas partes de la superficie ocular como son la córnea, la conjuntiva y la glándula lagrimal (Kamada *et al.*, 2012; Guzman-Aranguez *et al.*, 2013). En esta parte del ojo, los nucleótidos y dinucleótidos son moléculas capaces de incrementar el volumen de la lágrima y la secreción de mucinas (Jumblatt *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2000; Fujihara *et al.*, 2001; Pintor *et al.*, 2002a; Pintor *et al.*, 2002b; Murakami *et al.*, 2003). En concreto, Ap₄A es un dinucleótido presente en la lágrima que despierta gran interés debido a su relevante papel como se ha comentado, por lo que se eligió este compuesto para el estudio de su acción sobre los niveles de dos importantes proteínas con acción

bactericida presentes en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda: la lisozima y la lactoferrina.

Ambas proteínas suponen uno de los primeros mecanismos de defensa a nivel ocular contra la infección microbiana, y sus niveles se encuentran reducidos con el avance de la edad (Mackie *et al.*, 1984) así como en ciertos estados patológicos relacionados con secreción lagrimal disminuida, como la queratoconjuntivitis seca o el síndrome de Sjögren (también denominado *sicca syndrome*) en el caso de la lisozima (Montero J.; van Bijsterveld, 1969; Mackie *et al.*, 1984) y en el ojo seco, tracoma, la conjuntivitis vernal o conjuntivitis papilar gigante inducida por lentes de contacto en el caso de lactoferrina (Ballow *et al.*, 1987; Rapacz *et al.*, 1988; Versura *et al.*, 2010).

Partiendo de la hipótesis de que un aumento de la concentración de dichas proteínas podría mejorar la acción bactericida de las lágrimas y preservar de este modo la salud de la superficie ocular, en este primer apartado se estudió el efecto producido tras la aplicación tópica de Ap₄A en la superficie lagrimal de conejos albinos de Nueva Zelanda. Los resultados obtenidos indicaron un aumento transitorio pero significativo de la concentración de lisozima y de lactoferrina en la lágrima de dichos animales. Estos hechos sugieren que Ap₄A podría ser útil para fortalecer la barrera de la película lagrimal favoreciendo el mantenimiento de la homeostasis en la superficie ocular, mediante el aumento del papel de defensa contra posibles infecciones en la misma, efecto mediado por la activación de receptores de tipo P2 tal y como muestran los resultados realizados utilizando un *cocktail* con tres antagonistas de los mismos (PPADS, suramina y RB-2).

La lisozima es secretada por las glándulas lagrimales principales y accesorias, y la lactoferrina es producida principalmente por las células acinares de la glándula lacrimal (Flanagan *et al.*, 2009) las cuales expresan receptores ionotrópicos (P2X_{2,3,4,5,6,7}) y metabotrópicos (P2Y_{1,2,4,12,14}) (Kamada *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las células epiteliales corneales y conjuntivales, donde se han identificado diversos receptores P2 (P2X₅, P2X₇, P2Y_{1, 2, 4, 6, 11}), también producen cantidades detectables de lactoferrina, siendo la expresión de los niveles de lactoferrina así como su RNAm mucho mayores en las células conjuntivales que en las corneales (Santagati *et al.*, 2005; Rageh *et al.*, 2015).

De esta forma son diversos los receptores P2 identificados en estas localizaciones que podrían inducir la liberación de las proteínas analizadas tras la activación con Ap₄A. El Ap₄A estimula preferentemente los receptores de tipo P2X₂, P2X₄ junto con P2Y₁ y P2Y₂. De entre todos estos receptores, en estudios previos del grupo se demostró la implicación del receptor P2Y₂ en el aumento de la secreción lagrimal inducida por Ap₄A. Así estos estudios revelaron que dicho dinucleótido produjo un aumento del 60% sobre la secreción de lágrima en conejos albinos de Nueva Zelanda. Los estudios realizados con antagonistas de receptores P2Y (PPADS, suramina y RB-2) no modificaron dicha secreción, excepto RB-2, que produjo una ligera reducción. En cuanto al subtipo de receptor de nucleótidos que puede estar involucrado en esta acción fisiológica, Ap₄A produjo un efecto considerable, frente a la falta de efecto observada en los mononucleótidos UDP y ADP (agonistas preferentes de los receptores P2Y₆ y de P2Y₁), lo que sugirió la implicación de receptores P2Y₂ (Ralevic *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta este hallazgo, sería posible especular acerca de la posible implicación de este receptor también en el aumento de los niveles de las proteínas de la lágrima lisozima y lactoferrina detectado tras la aplicación tópica de Ap₄A.

Un aspecto interesante a comentar es la posible implicación de otras proteínas en el efecto anti-microbiano observado en los experimentos realizados en el presente trabajo de investigación mediante la técnica de agar-agar. Podría pensarse, por ejemplo, que la lactoferrina también pudiera intervenir de manera significativa en el efecto de lisis de *Micrococcus lisodeikticus*, al ser uno de los componentes principales que intervienen en la acción bactericida de la lágrima. No obstante, otros estudios han demostrado que dicha proteína tan solo produce una disminución del 10% en su acción frente a la bacteria gram positiva *Micrococcus luteus* (de Lillo *et al.*, 1997), efecto observado a las 3.5 h, utilizando concentraciones cinco veces superiores de lactoferrina que las identificadas en las muestras de lágrima presentadas en este trabajo. Por lo tanto, cabe suponer que el incremento en el efecto de lisis observado con la técnica de agar-agar que se produce tras la aplicación tópica de Ap₄A se debe mayoritariamente a la acción de la lisozima.

Como conclusión de estos estudios, un aumento en los niveles de proteínas de la lágrima, como son la lisozima y la lactoferrina, implica una mejora en la acción bactericida producida por las mismas, pudiendo contribuir por consiguiente a prevenir la invasión producida por bacterias en las células epiteliales de la superficie ocular, así como a modular respuestas epiteliales para mejorar dicha protección. En consecuencia, podría suponer un posible tratamiento farmacológico para reforzar la barrera corneal frente a infecciones patógenas.

Asimismo, un aumento en los niveles de lisozima podría favorecer la estabilización de la película lagrimal, evitando así una excesiva evaporación y problemas en la superficie ocular, ya que parece contribuir a la disminución de la tensión superficial de la misma (Tragoulias *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2006). En cuanto a la lactoferrina, a parte de su actividad antibacteriana también se le ha atribuido capacidad antivírica, así

como propiedades protectoras frente al daño producido en la córnea y en la retina. En ratas, la aplicación tópica de lactoferrina de bovino reduce el daño producido por la radiación UVB en el epitelio corneal (Fujihara *et al.*, 2000). En ratones, la lactoferrina estimula la cicatrización de la herida tras el daño por quemaduras alcalinas (Pattamatta *et al.*, 2013). Asimismo, dicha proteína reduce las lesiones de neovascularización coroidea (Montezuma *et al.*, 2015). Todo esto hace que la lactoferrina tenga un potencial terapéutico importante para tratar lesiones oculares (Rageh *et al.*, 2015).

En consecuencia, el incremento en los niveles de estas proteínas inducido por Ap₄A además de reforzar la barrera corneal frente a infecciones bacterianas también contribuiría a estimular las otras funciones atribuidas a dichas proteínas.

2. Papel biológico de Ap₄A en la función de barrera de la superficie corneal

Con el fin de conocer los posibles elementos que podrían contribuir a modular la función de barrera del epitelio corneal y debido a la relevante implicación del Ap₄A a nivel ocular se procedió al análisis del papel biológico de dicha molécula sobre la función de barrera epitelial corneal.

En primer lugar, se realizaron estudios *in vitro* para analizar la resistencia eléctrica epitelial (TEER) en la línea celular epitelial corneal e inmortalizada (HCLE) tras la aplicación de diferentes dinucleótidos (Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A) y mononucleótidos (ATP, UTP, ADP y UDP).

Se obtuvo en todos los casos una significativa reducción de los niveles de TEER, excepto para los mononucleótidos difosfato, ADP y UDP, donde no se produjeron reducciones tan marcadas. Dichos valores reducidos de TEER son inversamente proporcionales a la permeabilidad de las TJ, lo que indicó que la aplicación de estos compuestos originaba una disminución concomitante y transitoria en la función de barrera formada por dichas proteínas y por consiguiente un efecto sobre la permeabilidad de la barrera epitelial corneal, incrementándola. Los compuestos que produjeron valores significativamente más reducidos de TEER fueron el dinucleótido Ap_4A y el mononucleótido UTP, por lo que fueron seleccionados para la realización de los estudios correspondientes sobre la función de barrera. No obstante, debido a las diferentes funciones relevantes de Ap_4A en el ojo comentadas anteriormente, esta molécula fue elegida como eje principal a estudiar a lo largo de este trabajo, complementando algunos de los estudios con el mononucleótido UTP.

En todos los ensayos realizados *in vitro* los tratamientos llevados a cabo con Ap_4A (y con UTP) se efectuaron durante 5 minutos, ya que este es el tiempo máximo que cualquier compuesto puede permanecer en la superficie ocular antes de ser drenado por el punto lagrimal y se consideró un tiempo de incubación adecuado, con el objetivo de simular dichas condiciones (Lang, 1995).

Para el análisis de Ap_4A en la función de barrera corneal se realizaron diferentes estudios mediante inmunodetección e inmunotransferencia y se seleccionaron tres de las proteínas integrantes de las TJ corneales tales como la ZO-1, ocludina y claudina-7. La selección de dichas proteínas para los objetivos planteados se realizó en base a la bibliografía descrita en córnea humana y de conejo, escogiendo una proteína citoplasmática asociada a la periferia de la membrana (ZO-1), y dos proteínas de membrana (occludina y claudina-7).

La ZO-1 es una proteína citoplasmática descrita inicialmente como un componente de las uniones estrechas de células epiteliales y endoteliales (Stevenson *et al.*, 1986; Itoh *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1993; Jesaitis *et al.*, 1994; Petroll *et al.*, 1996). La ZO-1 desempeña un papel importante en la formación de las TJ (Itoh *et al.*, 1993; Willott *et al.*, 1993; Itoh *et al.*, 1999), y funciona como una proteína de señalización celular en múltiples tipos de células, contribuyendo a la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Tsukita *et al.*, 2008).

Tanto la ocludina (primera proteína integral descubierta de las TJ) como la familia de las claudinas son proteínas principales dentro del complejo de las TJ, que controlan directamente el flujo del espacio intercelular, y seleccionan la difusión de los diferentes tipos de iones y moléculas (Hu *et al.*, 2013). Las claudinas son vitales para el establecimiento de las TJ, y la distribución de sus isoformas depende en gran parte de las características del tejido u órgano de que se trate (Hu *et al.*, 2013). Dentro de las claudinas que se expresan en los epitelios corneal y conjuntival, se eligió a la claudina-7 al mostrar los mayores niveles proteicos en células corneales humanas en ausencia de tratamiento alguno (Ko *et al.*, 2009).

En los ensayos de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica analizando la distribución de la proteína constituyente de las TJ, ZO-1, en ausencia de Ap₄A o tras el tratamiento con el dinucleótido, fue posible detectar en el caso de las células control el marcaje típico de dicha proteína, caracterizado por marcar de manera selectiva la membrana de todas las células (Ban *et al.*, 2003; Mandell *et al.*, 2006; Mandell *et al.*, 2007; Yanai *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). En cambio, 2 h después del tratamiento de las células HCLE durante 5 minutos con Ap₄A, los ensayos *in vitro* mostraron la alteración del marcaje de ZO-1 observándose la pérdida de la tinción característica a modo de líneas continuas a lo largo de las regiones célula-célula, que

aparecían en las células control. De forma similar, en los estudios de inmunohistoquímica realizados mediante preparaciones de córneas de conejos albinos de Nueva Zelanda montadas en plano para estudiar la distribución de la ZO-1 en el epitelio de las mismas tras la aplicación tópica 2 h antes de Ap_4A , se obtuvieron resultados que indicaban una alteración en el marcaje de dicha proteína, así como una disminución en su intensidad. En cambio, 24 h después de la aplicación del dinucleótido, se observó un patrón similar al que apareció en las córneas control, en ausencia de Ap_4A , lo que indica que se trata de una modificación de tipo temporal.

Asimismo, para analizar el efecto de la aplicación de Ap_4A durante 5 minutos sobre los niveles proteicos de las tres proteínas constituyentes de las TJ se realizaron ensayos de Western Blot que mostraron cambios significativos 2 h después del pretratamiento con Ap_4A , con reducciones en los niveles proteicos de la ZO-1 (59.3%), la ocludina (57.9%) y la claudina-7 (58.8%) en comparación con las células utilizadas como control.

La siguiente cuestión que nos planteamos en el presente estudio fue qué receptor purinérgico podría estar involucrado en los efectos observados en la función de barrera corneal. Son muchos los receptores de tipo P2 que aparecen en las distintas partes de la superficie corneal. Concretamente, en el epitelio se han descrito receptores de tipo P2X (P2X5 y P2X7), así como P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) en diferentes especies (ver Tabla 5).

Por otra parte, Ap_4A es agonista preferente de receptores P2X2, P2X4 junto con P2Y₁ y P2Y₂, tal y como se ha comentado anteriormente. Dentro de estos receptores, los resultados obtenidos en los ensayos de TEER con los mononucleótidos, sugerirían que el receptor P2Y₂ podría ser el responsable de la

acción de Ap₄A sobre la función de barrera. Así, mientras ADP (buen agonista de P2Y₁) y UDP (agonista de P2Y₆) no indujeron cambios en las medidas del TEER, el mononucleótido ATP, así como el UTP, ambos agonistas del receptor P2Y₂ al igual que el dinucleótido Ap₄A, redujeron significativamente los valores de TEER. Por otro lado, estudios previos del grupo empleando células de epitelio corneal de conejo demostraron que el Ap₄A ejerce algunas de sus funciones en la superficie corneal (en concreto el incremento de la cicatrización corneal) a través de la estimulación del receptor P2Y₂ (Mediero, 2010; Guzman-Aranguez *et al.*, 2013).

Por ello, se procedió a estudiar la posible implicación del receptor P2Y₂ en el efecto producido por Ap₄A sobre las TJ y la función de barrera mediante el silenciamiento de dicho receptor con siRNAs específicos. El silenciamiento de la expresión génica mediante la utilización de siRNA supone, desde hace años, una herramienta muy interesante para el estudio de la implicación de las proteínas en los procesos bioquímicos, en la fisiología de los tejidos, y en el tratamiento de patologías (Wadhwa *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2007; Dore-Savard *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos *in vitro* tras la aplicación de los siRNA frente al receptor P2Y₂ demostraron la implicación del mismo en los procesos estudiados, ya que tras su silenciamiento se consiguió revertir el efecto de Ap₄A sobre los niveles proteicos de las TJ en las células HCLE.

Una vez identificado el receptor purinérgico que parece mediar la acción de Ap₄A, se procedió a abordar el estudio de las rutas de transducción de señales implicadas en este proceso, centrándonos en la vía de señalización ERK 1/2. La activación de dicha ruta parece producir importantes cambios en la función de barrera

paracelular. Así, se ha demostrado que la activación de ERK 1/2 desencadenada por diversos agentes como factores de crecimiento (Feldman *et al.*, 2007), la citoquina IL-17 (Kinugasa *et al.*, 2000), la bilis (Yang *et al.*, 2005) y compuestos de tiol (Usatyuk *et al.*, 2006) pueden originar un aumento de la función de barrera de las TJ. Por otra parte, la activación de ERK 1/2 inducida por factores como el estrés oxidativo (Krizbai *et al.*, 2005), metaloproteinasas (Tan *et al.*, 2005), factores de crecimiento (Ogawa *et al.*, 2012) y citoquinas (Petecchia *et al.*, 2012) también pueden estar involucradas en la interrupción de las TJ. Estos hallazgos indican que la activación de la vía ERK 1/2 puede conducir al ensamblaje o desensamblaje de las TJ dependiendo del estímulo y del tipo celular en cuestión.

En las células HCLE fue posible detectar la activación de la ruta ERK 1/2 tras la aplicación de Ap₄A. Esta activación fue bloqueada en presencia del siRNA para el receptor P2Y₂, lo que indica la vinculación existente entre la estimulación del receptor P2Y₂ y la consiguiente activación de dicha ruta. Además, el empleo de un inhibidor específico (U0126) de esta cascada de señalización revirtió el efecto producido por Ap₄A en la disminución de los niveles de la ZO-1, ocludina y la claudina-7, lo que confirma la implicación de la ruta ERK1/2 en el efecto de Ap₄A sobre las TJ del epitelio corneal.

En consonancia con los resultados presentados, también se comprobó la implicación de la activación de la vía de señalización ERK 1/2 en la disrupción de las TJ de células epiteliales corneales inmortalizadas con SV40 (Wang *et al.*, 2004). Además, estos autores demostraron que la activación de PKC activaba la fosforilación de ERK, lo cual a su vez produjo alteraciones en las TJ, y por lo tanto en la función de barrera. Un aspecto interesante a considerar es que la vía de señalización PLC/PKC es una vía clásica ligada a la activación del receptor P2Y₂ en la mayoría de los tejidos

incluyendo el ojo (Guzman-Aranguez *et al.*, 2013). En estudios realizados en nuestro laboratorio en células epiteliales corneales de conejo, se demostró que la activación del receptor P2Y₂ inducida por Ap₄A estimula la cascada de las ERK de manera dependiente de la activación de PLC/PKC (Mediero *et al.*, 2011). Adicionalmente, también ha sido descrito un posible *cross-talk* entre los receptores P2Y₂ y receptores de tipo tirosina quinasas, produciendo la activación de ERK (Mediero *et al.*, 2008). Por ello, tanto la activación de PKC como los mecanismos dependientes de señalización de tirosina quinasa podrían contribuir a vincular la estimulación del receptor P2Y₂ inducida por Ap₄A con la activación de ERK, resultando en la disrupción de las TJ.

La reducción en los niveles proteicos de las TJ observada puede ser debida al incremento en la degradación de dichas proteínas, un fenómeno que puede ocurrir a tiempos cortos, como los empleados en los ensayos realizados (entre las 2 h y las 4 h, fundamentalmente). La estabilidad de las TJ puede ser regulada por varias modificaciones post-transcripcionales (fosforilación, ubiquitinación) que dirigen a estas proteínas hacia su internalización o endocitosis y posterior degradación. De esta forma, la activación de la ruta ERK1/2 podría incrementar la endocitosis y posterior degradación de las TJ como se ha demostrado en otras líneas celulares. Así, el EGF disminuyó los niveles de la claudina-2 a las 3 h en las células de riñón Madin Darby-II mediante el aumento de su tasa de degradación (Ikari *et al.*, 2011). En particular, EGF aceleró la endocitosis y la degradación lisosomal dependiente de la clatrina de las TJ mediante la activación de la vía de señalización intracelular MEK/ERK. En consonancia con la implicación de la vía MAPK en la degradación de proteínas constituyentes de las TJ, se ha demostrado la estabilización de la ocludina y ZO-1 mediante el aumento de sus vidas medias, mediado a través de la inhibición de las MAPK en la actividad de las células de riñón Madin-Darby-II (Chen *et al.*, 2000). Del mismo modo, la fosforilación y la ubiquitinación de la ocludina inducida por el factor de

crecimiento endotelial vascular aceleró la tasa de degradación de la misma detectado en presencia del inhibidor de la biosíntesis de proteínas cicloheximida, obteniéndose niveles decrecientes de la ocludina (alrededor de 60%) a las 1.5 h (Murakami *et al.*, 2009). Por otra parte, los estudios en otras líneas celulares epiteliales (LLC-PK1 y IEC-6) indicaron que la ocludina mostró una vida media corta de 1.5 a 2 h, lo que sugiere que podría ser posible detectar una disminución en los niveles de dicha proteína debido al aumento de la velocidad de degradación en la escala de tiempo analizado en los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral (Traweger *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta el efecto del Ap_4A sobre las TJ y la función de barrera del epitelio corneal, una pregunta relevante es saber si al abrir la vía paracelular se podría facilitar la entrada de moléculas de gran tamaño o incluso de patógenos. Con tal fin, se realizaron estudios *in vitro* analizando si los cambios inducidos por Ap_4A sobre la permeabilidad paracelular corneal afectaban la entrada de colorantes de pesos moleculares comprendidos entre 302.28 g/mol y 960.81 g/mol. Los resultados indicaron que la facilidad de entrada del colorante de menor peso molecular utilizado, hematoxilina, para pasar a través de la barrera epitelial era igual en presencia o en ausencia del tratamiento con el dinucleótido. Utilizando azul de bromofenol, de peso molecular intermedio entre los dos citados anteriormente (669.96 g/mol), se observó cómo Ap_4A favoreció la entrada de dicho compuesto en la monocapa de células corneales epiteliales y, por el contrario, el colorante azul de Evans (de peso molecular 960.81 g/mol), no parecía capaz de atravesar la barrera corneal, tanto en presencia como en ausencia de Ap_4A . Una cuestión a considerar es que el tamaño de los compuestos que atraviesan la córnea no es el único factor determinante en este proceso, sino que las características físico-químicas de los propios compuestos, por ejemplo su distinta carga, estructura y solubilidad, son factores que van a tener una importante influencia en su capacidad de entrada. Por ejemplo, estudios realizados en

tejidos oculares desepitelializados con el objetivo de valorar la penetración de nanopartículas tioladas y PEGiladas (750 y 5000 Da) en los mismos, revelaron que las interacciones que se producían entre la superficie de la córnea y los grupos tiol de las nanopartículas determinaron de manera más significativa la penetración de los compuestos que el tamaño de las propias partículas. La PEGilación con polietilenglicol de un peso molecular más alto (5.000 Da) permitió, tras una fase inicial de retardo de 1 hora, la penetración de las nanopartículas en el estroma (Mun *et al.*, 2014).

En conclusión y a tenor de los resultados descritos, como se muestra en la Figura 60, el dinucleótido Ap_4A modifica temporalmente la integridad de las TJ a través de la activación del receptores $P2Y_2$ y la consiguiente activación de la ruta intracelular ERK 1/2, confirmando que la activación de dicha ruta favorece la desaparición transitoria de las proteínas que forman las TJ.

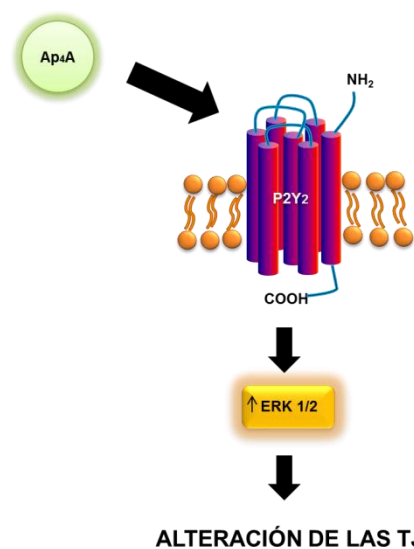


Figura 60. Mecanismo de acción de Ap_4A sobre la función de barrera corneal.

3. Papel biológico de Ap₄A en la mejora de la liberación de agentes hipotensores (5-MCA-NAT y compuestos adrenérgicos) en el interior del ojo

Los resultados obtenidos *in vitro* comentados en el apartado anterior mostraron la disminución de los niveles de proteínas integrantes de las TJ tras la aplicación de Ap₄A, con el consiguiente aumento de la permeabilidad paracelular y disminución de la función de barrera corneal. En base a este efecto, se abordaron estudios *in vivo* con el fin de analizar si, tras la aplicación de Ap₄A, se producía también una mejora en la entrada en el interior del ojo así como en la eficacia de agentes capaces de reducir la PIO.

La administración tópica es la manera más utilizada para tratar patologías oculares, siendo empleada tanto en el segmento anterior como en el posterior del ojo (Wilson, 2004; Hornof *et al.*, 2005; Urtti, 2006). Sin embargo, limitaciones fisiológicas y anatómicas del ojo restringen la biodisponibilidad de los fármacos para acceder a su interior. Entre los mecanismos de protección que limitan la biodisponibilidad de los fármacos oculares se encuentra el recambio y drenaje de la película lagrimal que reduce el tiempo de residencia precorneal del fármaco así como diferentes barreras físicas que el fármaco debe atravesar para alcanzar su blanco de acción en el ojo (Urtti, 2006; Kompella *et al.*, 2010). Dentro de dichas barreras tiene un papel clave el epitelio corneal cuya función de barrera paracelular, como ya se ha comentado, depende de las TJ que sellan el espacio intercelular. Como consecuencia de estos factores limitantes, solamente una pequeña fracción de la dosis administrada por vía tópica (1-7%) es absorbida de forma productiva (Lang, 1995). Por ello son necesarias instilaciones frecuentes de soluciones concentradas de fármaco para lograr la acción terapéutica buscada. Una elevada frecuencia de aplicación puede generar problemas

de cumplimiento del régimen prescrito por parte del paciente. Además el uso frecuente de soluciones concentradas puede producir daño a nivel de la superficie ocular (Lee *et al.*, 2008; Ammar *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011). Asimismo una porción significativa del fármaco puede ser absorbida por la conjuntiva o llegar al sistema nasolacrimal que drena a la cavidad nasal y lleva a la absorción a la circulación sistémica produciendo también efectos secundarios indeseables (Schwartz *et al.*, 1990; Lomaestro, 2000; Frishman *et al.*, 2001).

Por ello, el estudio de la mejora de la función de barrera a nivel ocular para poder favorecer la liberación de fármacos en el ojo sigue siendo uno de los mayores desafíos para la industria farmacéutica (Hornof *et al.*, 2005). En concreto, los estudios realizados se centraron en evaluar si el diadenosin tetrafosfato, gracias a su capacidad de modificar la permeabilidad de la córnea, podría mejorar el acceso y consiguientemente la eficacia de fármacos hipotensores, tales como el análogo de la melatonina 5-MCA-NAT y los compuestos adrenérgicos brimonidina y timolol. El empleo del 5-MCA-NAT se debe a que es un análogo de melatonina que se lleva estudiando desde hace más de 15 años en nuestro laboratorio y que presenta propiedades hipotensoras de la PIO muy relevantes (Pintor *et al.*, 2001; Pintor *et al.*, 2003a). Respecto a la brimonidina y timolol está claro que se trata de compuestos comerciales ampliamente empleados en el tratamiento del glaucoma por lo que resultan atractivos para este estudio (Katz, 1999).

Se seleccionaron este tipo de fármacos al ser el glaucoma una patología que demanda un tratamiento farmacológico crónico y que afecta a más de 65 millones de personas, e incluso se prevé que la neurodegeneración glaucomatosa afectará a unos 80 millones de personas en el año 2020 (Quigley *et al.*, 2006).

Con tal fin, se comenzó realizando ensayos de HPLC para averiguar la cantidad de dichos compuestos que accedía al interior del humor acuoso de conejos albinos de Nueva Zelanda en presencia o en ausencia de Ap_4A . Los resultados obtenidos demostraron que es posible triplicar la cantidad de 5-MCA-NAT que entra en el ojo, debido a la modificación de la permeabilidad corneal a través del efecto de Ap_4A , al ser aplicado 2 h antes. Del mismo modo se obtuvo un mayor efecto sobre la PIO cuando Ap_4A era aplicado 2 h antes que el análogo de la melatonina.

Uno de los factores clave y determinantes en nuestros estudios realizados *in vitro*, y que también lo fue en los estudios *in vivo*, ha sido el momento de aplicación del dinucleótido. De este modo, pudimos comprobar que, cuando se aplicaba simultáneamente Ap_4A y el análogo de la melatonina, no se producía un aumento en la entrada de 5-MCA-NAT, ni un mayor efecto sobre la PIO. Sin embargo, únicamente cuando Ap_4A era aplicado 2 h antes que 5-MCA-NAT se pudieron observar cambios significativos en la permeabilidad y en la disminución de la presión intraocular de los animales. Esto sugiere que, tras la activación de los receptores $P2Y_2$, podría estar iniciándose la activación de mecanismos intracelulares, lo cual requeriría cierto tiempo (aproximadamente 2 h) para tener un efecto notable, en términos de aumento de paso de 5-MCA-NAT.

De hecho, mediante el empleo de antagonistas de receptores P2 (PPADS, suramina y RB-2), así como de RNAs de interferencia se confirmó también *in vivo* la implicación del receptor $P2Y_2$ en la acción potenciadora de la entrada y eficacia del fármaco 5-MCA-NAT.

Además de evaluar el efecto del Ap_4A en la entrada y eficacia del compuesto 5-MCA-NAT, como se ha comentado previamente, también se analizó la acción del Ap_4A en la entrada y efectividad de fármacos frecuentemente prescritos en el tratamiento del

glaucoma como son los compuestos adrenérgicos brimonidina (agonista de receptores α_2 -adrenérgicos) y timolol (antagonista de receptores β -adrenérgicos). Los primeros actúan reduciendo la producción de humor acuoso e incrementando la salida del mismo a través de la vía uveoescleral, mientras que los antagonistas de receptores β -adrenérgicos pueden actuar reduciendo la producción de humor acuoso (Watanabe *et al.*, 1983; Toris *et al.*, 1995; Kiel *et al.*, 2011).

Los resultados de HPLC mostraron niveles más elevados de dichos agentes adrenérgicos en el humor acuoso de los conejos (cuatro veces más elevados en el caso de brimonidina y tres veces más en el caso de timolol), cuando se aplica 2 h antes el Ap₄A en comparación con el fármaco aplicado de manera individual. Asimismo, los cambios más robustos en la PIO se produjeron tras la aplicación de ambos compuestos 2 h después del tratamiento con Ap₄A, lo que confirmó el aumento de la permeabilidad epitelial corneal inducida por el nucleótido.

Como se ha comentado anteriormente, la cantidad de fármaco que penetra al interior del ojo es muy baja (Kompella *et al.*, 2010). Este hecho implica que sean necesarias aplicaciones frecuentes de fármacos a elevadas concentraciones para alcanzar los efectos terapéuticos necesarios, y estas aplicaciones discontinuas podrían resultar en fluctuaciones extremas de los niveles de fármacos a nivel intraocular, y además una parte importante del compuesto aplicado podría ser absorbido por la conjuntiva o acumularse en el sistema nasolacrimal, alcanzando la cavidad nasal y posiblemente la circulación sanguínea. La presencia de fármacos como timolol en el torrente sanguíneo puede producir efectos adversos a nivel cardiovascular y pulmonar, pudiendo presentar bronquiospasmo, parada cardíaca, bradicardia así como posibles cambios adversos en los niveles de lípidos del plasma (Coleman *et al.*, 1990; Everitt *et al.*, 1990; Frishman *et al.*, 2001). A su vez, se han

identificado algunos efectos adversos a nivel ocular. Estudios publicados realizados durante 12 meses en los que se aplicó brimonidina 0.2% dos veces al día a pacientes, describieron ciertas reacciones alérgicas a nivel ocular, así como folículos conjuntivales y edema palpebral, mientras que en el caso de timolol (0.5%) se detectaron fenómenos tales como quemazón y escozor ocular (Katz, 1999).

Con esta perspectiva introducida, se pretendía facilitar la administración de fármacos con acción hipotensora dentro del ojo. En este sentido, podría resultar de interés la combinación de Ap_4A y fármacos como la brimonidina o el timolol, pudiendo reducirse la cantidad de estos compuestos adrenérgicos que necesita ser aplicada para obtener un valor de PIO determinado. Del mismo modo se podrían hacer correcciones en las dosis prescritas, pudiendo así reducir los efectos potenciales secundarios producidos por ambos fármacos, tales como la alergia ocular inducida por la brimonidina o los efectos cardiovasculares y respiratorios debidos a timolol, siendo incluso valorable la posibilidad de prescripción en niños (Weinreb *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2010).

A pesar de que este trabajo se ha centrado en el estudio de los compuestos adrenérgicos utilizados para el tratamiento de la hipertensión ocular relacionada con glaucoma, este enfoque podría aplicarse a otros compuestos de uso común tales como prostaglandinas o inhibidores de anhidrasa carbónica (Loftsson *et al.*, 2012; Alm, 2014).

Asimismo, una de las mayores dificultades que aparecen a nivel ocular es el tratamiento de patologías del segmento posterior del ojo, tales como la degeneración macular asociada a la edad, la degeneración retiniana y la retinopatía diabética, y la liberación de los fármacos para su correcto tratamiento se realiza mediante la

administración intravítrea (Wilson, 2004; Hughes *et al.*, 2005; Ranta *et al.*, 2006; Laude *et al.*, 2010; Thrimawithana *et al.*, 2011; Bochot *et al.*, 2012). Aunque dicha administración es una forma directa para proporcionar los niveles de fármacos necesarios en el tratamiento de estas patologías, supone a la vez una forma invasiva que presenta una serie de complicaciones secundarias graves como pueden ser desprendimiento de retina, hemorragias, endoftalmitis y cataratas. Otra complicación añadida es que suelen necesitarse inyecciones repetidas de los fármacos, lo cual no es bien tolerado por los pacientes. Este hecho indica la necesidad de disponer de otras alternativas menos invasivas de administración a nivel intraocular que impliquen menos riesgos asociados (Geroski *et al.*, 2000; Ranta *et al.*, 2006) y en este sentido sería interesante evaluar la potencial aplicación de Ap₄A para facilitar la entrada a los fármacos empleados en estas patologías.

Por otra parte, ante el efecto observado sobre la función de barrera corneal debido a la acción del Ap₄A, sería posible pensar que una apertura leve aunque transitoria de las TJ podría originar cierta toxicidad o producir un aumento en la penetración de patógenos. Los estudios de viabilidad celular realizados *in vitro* demostraron que la aplicación de Ap₄A durante 24 h no producía cambios significativos en dicha viabilidad celular después del tratamiento con el dinucleótido, lo que indicó que esta molécula no inducía ningún efecto citotóxico sobre las células corneales epiteliales HCLE. De la misma forma, el estudio de la salud ocular de los animales tras la aplicación de Ap₄A no produjo ningún efecto adverso, lo que indicó que el dinucleótido es un compuesto inocuo, que no produce efectos tóxicos tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*.

Por otro lado, con respecto al posible aumento de la penetración de patógenos a través de la barrera protectora de la córnea, nuestros resultados mostraron que el

Ap₄A tiene la capacidad de incrementar la concentración de lisozima y de lactoferrina en lágrima. Por ello, el aumento de los niveles de estas proteínas de acción antimicrobiana inducido por Ap₄A podría aminorar el riesgo de potenciales infecciones.

En este sentido, estudios anteriores sugirieron la existencia de otros factores de defensa que podrían compensar la interrupción de la barrera corneal formada por las TJ, las cuales parece que no tienen que estar completamente formadas en su totalidad para excluir bacterias (Lee *et al.*, 2003). En estudios realizados en ratón C57BL/6 en los que se desarrolló un nuevo modelo infeccioso de queratitis producida por *Pseudomona aeruginosa* se observó que 6 h después de generar heridas en las córneas de los animales, estos eran susceptibles a la infección por *Pseudomona aeruginosa*, recuperando su resistencia frente a la infección después de 12 h. Curiosamente, en este tiempo de 12 horas se apreció una significativa tinción con fluoresceína, indicativa de un aumento de la permeabilidad epitelial, lo que parece indicar la posible existencia de otros factores de defensa frente a la infección, pudiendo compensar la pérdida de la función de barrera.

En resumen, la aplicación de Ap₄A facilita la entrada de compuestos anti-glaucomatosos dentro del ojo. Este nuevo procedimiento contribuiría a incrementar la penetración de estos fármacos a nivel intraocular y mejorar de este modo la eficiencia terapéutica, lo cual podría sugerir una posible línea de investigación en el tratamiento del glaucoma. Además, sería igualmente interesante ampliar el estudio a otros fármacos de acción intraocular destinados al tratamiento de otras patologías oculares.

4. Implicación del Ap₄A en los cambios producidos en el endotelio de un modelo de ratón glaucomatoso (DBA/2J)

En este último apartado objeto de discusión, se analizará la implicación del diadenosin tetrafosfato o Ap₄A en los cambios observados en la córnea del ratón DBA/2J, modelo animal que desarrolla espontáneamente un glaucoma de tipo exfoliativo (Anderson *et al.*, 2002).

El progreso de la patología glaucomatosa en este modelo animal ocurre como consecuencia de cambios producidos en cámara anterior, desarrollándose el glaucoma debido a la dispersión del pigmento del iris (IPD) y la atrofia del estroma del iris (ISA) causado por las mutaciones en los genes *Gpnmb* y *Tyrp1* (John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2007). Asimismo, en el ratón DBA/2J están descritas una serie de características a nivel ocular y en particular, en la córnea, aparecen una serie de fenómenos como calcificaciones, edema, oclusiones, ulceración e inflamación corneales en ciertos estadios de edad (Sheldon *et al.*, 1995; John *et al.*, 1998; Danias *et al.*, 2003).

Una de las posibles causas de la edematización observada en la córnea del ratón DBA/2J podría ser la alteración de las proteínas TJ presentes en el endotelio corneal lo que podría incrementar la permeabilidad del endotelio al paso de agua y otros componentes del humor acuoso al estroma corneal desencadenando dicho proceso de edematización.

Estudios previos han demostrado que existe un aumento de los niveles de Ap₄A en el humor acuoso de pacientes con glaucoma (15 veces superiores frente a los pacientes sin glaucoma), así como del mononucleótido ATP (niveles 14 veces

superiores frente a los sujetos control) (Castany *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta el efecto que la exposición a este dinucleótido ejerció sobre la expresión y función de las TJ a nivel del epitelio corneal, podría especularse una acción parecida sobre las TJ del endotelio de la córnea. De esta forma, un aumento en los niveles de Ap_4A en el humor acuoso de estos animales podría desencadenar la alteración de las TJ del endotelio corneal y contribuir así al proceso de edematización observado en el ratón DBA/2J.

En los estudios de este último apartado se analizó, en primer lugar, si se producía, al igual que en los pacientes, un incremento en los niveles de Ap_4A y ATP en el humor acuoso del ratón DBA/2J en dos estadios diferentes, tres y quince meses (en ausencia de la patología y donde la enfermedad está avanzada, respectivamente), comparándose además con los niveles presentes en el ratón control C57BL/6. Los resultados de HPLC mostraron que los niveles de ambos nucleótidos aparecían incrementados en el humor acuoso del ratón DBA/2J, en comparación con los detectados en la cepa control no patológica, el ratón C57BL/6, indicando que este modelo animal mimetiza los cambios asociados a los niveles de nucleótidos en pacientes con glaucoma.

El aumento elevado de ATP detectado en el humor acuoso del ratón DBA/2J podría explicarse por la posible hidrólisis del Ap_4A por ectonucleotidasas, enzimas capaces de hidrolizar los diadenosina polifosfatos en diferentes modelos celulares, como son las células endoteliales de aorta, las células de los endotelios vasculares de medula suprarrenal, las células neurocromafines bovinas, así como en diferentes tejidos de vertebrados (Goldman *et al.*, 1986; Rodríguez-Pascual *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 1995; Mateo *et al.*, 1997a; Mateo *et al.*, 1997b; Gasmi *et al.*, 1998; Vollmayer *et al.*, 2003). Las ectodinucleotidasas presentan poca especificidad por la base

constituyente de los dinucleótidos y se caracterizan por una hidrólisis asimétrica de los mismos.

La presencia de dichos niveles elevados de Ap_4A y de ATP en el humor acuoso de este modelo animal podría influir en procesos fisiológicos como la PIO. Se ha demostrado que Ap_4A actúa disminuyendo o aumentando la PIO, en función del receptor que active. A modo de ejemplo, el diadenosin tetrafosfato disminuye la PIO mediante la activación de receptores $P2Y_1$ presentes en la malla trabecular facilitando la salida del humor acuoso (Soto *et al.*, 2005). Del mismo modo se ha descrito un efecto hipotensor presumiblemente mediado por receptores $P2X$ presentes en las terminales nerviosas que inervan los procesos ciliares (Pintor, 2005). Por otra parte, trabajos previos realizados en el grupo han sugerido la implicación de agonistas de receptores $P2Y_2$ presentes en el cuerpo ciliar, los cuales producen el efecto contrario, aumentando la PIO en conejos albinos de Nueva Zelanda (Martin-Gil *et al.*, 2012). Del mismo modo, Ap_4A produce un aumento de la expresión de la acuoporina-1 mediante la activación de receptores $P2Y_2$, incrementando el tráfico de la misma a la membrana plasmática de las células epiteliales ciliares, facilitando así la producción de humor acuoso, y aumentando, de este modo, la PIO (Martín-Gil.; Pintor, 2010; Martin-Gil, 2010). Este efecto dual sobre la PIO depende de la afinidad que presenta el dinucleótido Ap_4A para cada tipo de receptor, siendo probablemente el factor más relevante para poder predecir qué receptor tiene la mayor contribución sobre la PIO. En este sentido, está descrita la afinidad de Ap_4A para el receptor $P2Y_1$, con un valor EC_{50} de aproximadamente 0.16 μM , y de 91.2 nM para el receptor $P2Y_2$ (Guzman-Aranguez *et al.*, 2007). Nuestros estudios mediante HPLC mostraron concentraciones de Ap_4A de 12.25 μM en el estadio de quince meses del ratón DBA/2J, lo que sería más que suficiente para estimular el receptor $P2Y_2$, con el consecuente aumento de la PIO.

En el caso de ATP, cuyos niveles se incrementan en el ratón glaucomatoso, también se ha descrito la preferencia por la activación del receptor $P2Y_2$ frente al $P2Y_1$ (Zhang *et al.*, 2007), siendo, además, el receptor $P2Y_1$, más efectivo para ADP que para ATP (Janssens *et al.*, 1996). De nuevo con una concentración detectada de ATP de 15.25 μM en el humor acuoso del estadio de quince meses del ratón DBA/2J sería posible esa estimulación del receptor $P2Y_2$ y el incremento de la PIO.

En el ratón DBA/2J se producen cambios sustanciales a los 8 meses de edad en el espesor corneal, observándose un aumento y asimetría del mismo en comparación con cepas control, tales como el C57BL/6J (Chou *et al.*, 2011). Este hecho puede ser originado por un aumento de la PIO, lo cual por una parte podría ocasionar una hidratación corneal anormal (Foster C.S., 2005). Por otra, insuficiencia del endotelio de la córnea en la eliminación de exceso de líquido del estroma corneal (Chang *et al.*, 1999), o bien la combinación de ambas condiciones. Además del posible efecto del Ap_4A sobre la PIO y su consiguiente repercusión en la barrera endotelial, tal y como hemos hipotetizado inicialmente, este dinucleótido podría afectar directamente a la formación de uniones estrechas y a la permeabilidad de la barrera endotelial, de forma similar a la ejercida en el epitelio corneal, contribuyendo también al proceso de edematización observado en los ratones DBA/2J.

De este modo, con el fin de conocer el posible efecto de los niveles elevados de Ap_4A sobre la función de barrera corneal endotelial en el ratón DBA/2J, se estudió mediante inmunodetección la expresión y distribución de proteínas constituyentes de las TJ, en concreto de ZO-1, en el endotelio de dichos animales, encontrándose claras diferencias en la distribución de esta proteína en el endotelio de ratones DBA/2J a los quince meses de edad en comparación con los mismos ratones de tres meses, así como con la cepa control en ambos estadios de edad. Del mismo modo, se observó

una disminución en los niveles de dicha proteína en el ratón DBA/2J a los quince meses de edad, tal y como muestran nuestros resultados obtenidos tras los estudios realizados por inmunotransferencia y comparándolos a los tres y quince meses con la cepa control C57BL/6 de la misma edad.

Estos resultados sugieren que el Ap₄A encontrado en el humor acuoso de los ratones glaucomatosos podría efectivamente estar alterando las TJ y la barrera endotelial. No obstante, también pueden existir otros factores o agentes en el humor acuoso, contribuyendo a los cambios en la permeabilidad del endotelio, como por ejemplo mediadores inflamatorios tales como las citoquinas. En este sentido, se han encontrado niveles proteicos significativamente elevados de la citoquina proinflamatoria interleuquina-18 (IL-18), en el humor acuoso del ratón DBA/2J durante el progreso de la patología (Zhou *et al.*, 2005). Es conocida la acción que las citoquinas pueden ejercer reduciendo la función de barrera de las TJ (Kimura *et al.*, 2009; Kimura, 2010). En el caso de la IL-18 se ha descrito que produce un aumento en la permeabilidad de células epiteliales del colon al disminuir la fosforilación de las proteínas ocludina y claudina-1 si bien se desconoce si puede ejercer un efecto similar en el caso de las células endoteliales de la córnea (Li *et al.*, 2012).

En conclusión, la exposición continua al dinucleótido Ap₄A cuyos niveles están significativamente elevados en el humor acuoso de ratones DBA/2J en edad avanzada, podría estar activando receptores de tipo P2Y₂, y modificar la expresión proteica y funcionalidad de las TJ del endotelio contribuyendo así al proceso de edematización descrito. A parte de la acción del Ap₄A, no se puede descartar también la implicación de otras moléculas presentes en el humor acuoso en la modificación de la función de barrera del endotelio corneal.

Conclusiones



CONCLUSIONES

1. La aplicación tópica de Ap₄A aumenta transitoriamente la concentración de lisozima y lactoferrina, dos proteínas con acción bactericida presentes en la lágrima de conejos albinos de Nueva Zelanda. Este hecho indica el potencial uso de Ap₄A en la prevención y modulación de invasiones bacterianas de la superficie ocular.
2. La aplicación tópica de Ap₄A modifica de manera temporal la integridad de las proteínas constituyentes de las TJ, aumentando la permeabilidad paracelular, hecho que se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Dicha acción sobre la función de barrera epitelial corneal se produce a través de la activación del receptor P2Y₂ y de la ruta intracelular ERK 1/2.
3. La aplicación tópica de Ap₄A facilita la entrada de compuestos anti-glaucomatosos dentro del ojo, como son el 5-MCA-NAT, la brimonidina y el timolol. Este hallazgo concuerda con la disminución de la función de barrera corneal producida por Ap₄A en el epitelio corneal, contribuyendo a la mejora de la penetración de fármacos a nivel intraocular y aumentando la eficiencia terapéutica de los mismos, lo que sugiere el potencial uso del Ap₄A en el tratamiento del glaucoma.
4. Las concentraciones de Ap₄A y de ATP en el humor acuoso del ratón glaucomatoso DBA/2J son significativamente elevadas en el estadio de quince meses, donde la patología está avanzada, de la misma manera que están descritos los niveles elevados de estos nucleótidos en pacientes con glaucoma.

5. La exposición continua al dinucleótido Ap_4A debido a los elevados niveles detectados en el humor acuoso de ratones DBA/2J en edad avanzada, podría estar activando receptores de tipo $P2Y_2$, modificando de este modo la expresión proteica y funcionalidad de las TJ del endotelio y contribuyendo así al proceso de edematización descrito en el mencionado animal.

Bibliografía



- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, *et al.* (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences* 24: 52-55.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* 58: 281-341.
- Abrams LS, Vitale S, Jampel HD (1996). Comparison of three tonometers for measuring intraocular pressure in rabbits. *Investigative ophthalmology & visual science* 37: 940-944.
- Adachi T, Teramachi M, Yasuda H, Kamiya T, Hara H (2012). Contribution of p38 MAPK, NF-kappaB and glucocorticoid signaling pathways to ER stress-induced increase in retinal endothelial permeability. *Archives of biochemistry and biophysics* 520: 30-35.
- Aghaian E, Choe JE, Lin S, Stamper RL (2004). Central corneal thickness of Caucasians, Chinese, Hispanics, Filipinos, African Americans, and Japanese in a glaucoma clinic. *Ophthalmology* 111: 2211-2219.
- Aho HJ, Saari KM, Kallajoki M, Nevalainen TJ (1996). Synthesis of group II phospholipase A2 and lysozyme in lacrimal glands. *Investigative ophthalmology & visual science* 37: 1826-1832.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003). Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Experimental eye research* 77: 681-686.
- Albert DMM, J.; Azar, DT.; Blodi, BA. (2008). *Alberts & Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology*. edn.
- Alexander DB, Iigo M, Yamauchi K, Suzui M, Tsuda H (2012). Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem Cell Biol* 90: 279-306.
- Alm A (2014). Latanoprost in the treatment of glaucoma. *Clinical ophthalmology* 8: 1967-1985.
- Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF (2003). Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *American journal of ophthalmology* 135: 584-590.
- Ammar DA, Noecker RJ, Kahook MY (2011). Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells. *Advances in therapy* 28: 501-510.
- Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL, *et al.* (2002). Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nature genetics* 30: 81-85.
- Argueso P (2013). Glycobiology of the ocular surface: mucins and lectins. *Japanese journal of ophthalmology* 57: 150-155.
- Argueso P, Guzman-Aranguez A, Mantelli F, Cao Z, Ricciuto J, Panjwani N (2009). Association of cell surface mucins with

galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *The Journal of biological chemistry* 284: 23037-23045.

Arnold RR, Cole MF, McGhee JR (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197: 263-265.

Augusteyn RC, Nankivil D, Mohamed A, Maceo B, Pierre F, Parel JM (2012). Human ocular biometry. *Experimental eye research* 102: 70-75.

Bai L, Zhang Z, Zhang H, Li X, Yu Q, Lin H, *et al.* (2008). HIV-1 Tat protein alter the tight junction integrity and function of retinal pigment epithelium: an in vitro study. *BMC Infect Dis* 8: 77.

Balda MS, Anderson JM (1993). Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *The American journal of physiology* 264: C918-924.

Balda MS, Matter K (2008). Tight junctions at a glance. *Journal of cell science* 121: 3677-3682.

Ballow M, Donshik PC, Rapacz P, Samartino L (1987). Tear lactoferrin levels in patients with external inflammatory ocular disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 28: 543-545.

Ban Y, Dota A, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, *et al.* (2003). Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Experimental eye research* 76: 663-669.

Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R (2006). MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* 393: 69-77.

Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC (2010). The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol* 2010: 402593.

Bennett ESW, B.A. (2004). Clinical Contact Lens Practice. Lippincott Williams and Wilkins.

Bergmanson J (2008). Clinical Ocular Anatomy and Physiology. 15: 67-94.

Bergmanson JP, Horne J, Doughty MJ, Garcia M, Gondo M (2005). Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope. *Eye Contact Lens* 31: 281-287.

Beuerman RW, Pedroza L (1996). Ultrastructure of the human cornea. *Microscopy research and technique* 33: 320-335.

Birk DE (2001). Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 32: 223-237.

Blasig IE, Bellmann C, Cording J, Del Vecchio G, Zwanziger D, Huber O, *et al.* (2011). Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxid Redox Signal* 15: 1195-1219.

Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, *et al.* (2003). Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Molecular pharmacology* 63: 1407-1416.

- Bochot A, Fattal E (2012). Liposomes for intravitreal drug delivery: a state of the art. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161: 628-634.
- Bonanno JA (2003). Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Progress in retinal and eye research* 22: 69-94.
- Boonstra A, Kijlstra A (1987). Guinea pig tears contain lactoferrin and transferrin. *Current eye research* 6: 1115-1123.
- Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M, Trinkaus-Randall V (2010). The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *American journal of physiology. Cell physiology* 299: C411-421.
- Bozkir G, Bozkir M, Dogan H, Ayca K, Guler B (1997). Measurements of axial length and radius of corneal curvature in the rabbit eye. *Acta Med Okayama* 51: 9-11.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Bringmann A, Pannicke T, Moll V, Milenkovic I, Faude F, Enzmann V, et al. (2001). Upregulation of P2X(7) receptor currents in Muller glial cells during proliferative vitreoretinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 42: 860-867.
- Bron AT, RC.; Tripathi, BJ. (1997). Wolff's Anatomy of the Eye and the Orbit. *The cornea and sclera*; 8: 233-267.
- Burnstock G (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological reviews* 24: 509-581.
- Burnstock G (2007a). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews* 87: 659-797.
- Burnstock G (2007b). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64: 1471-1483.
- Burnstock G (2012). Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *British journal of pharmacology* 167: 238-255.
- Burnstock G (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental physiology* 99: 16-34.
- Callewaert L, Michiels CW (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* 35: 127-160.
- Campbell M, Collery R, McEvoy A, Gardiner TA, Stitt AW, Brankin B (2006). Involvement of MAPKs in endostatin-mediated regulation of blood-retinal barrier function. *Current eye research* 31: 1033-1045.
- Capaldo CT, Nusrat A (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et biophysica acta* 1788: 864-871.
- Carracedo G, Peral A, Pintor J (2010). Diadenosine polyphosphates in tears of Sjogren syndrome patients. *Investigative ophthalmology & visual science* 51: 5452-5459.

- Carracedo G, Guzman-Aranguez A, Loma P, Pintor J (2013). Diadenosine polyphosphates release by human corneal epithelium. *Experimental eye research* 113: 156-161.
- Castany M, Jordi I, Catala J, Gual A, Morales M, Gasull X, *et al.* (2011). Glaucoma patients present increased levels of diadenosine tetraphosphate, Ap(4)A, in the aqueous humour. *Experimental eye research* 92: 221-226.
- Castro E, Torres M, Miras-Portugal MT, Gonzalez MP (1990). Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells. *British journal of pharmacology* 100: 360-364.
- Clareus F, histologi. (1857). Thesis.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* 63: 641-683.
- Coleman AL, Diehl DL, Jampel HD, Bachorik PS, Quigley HA (1990). Topical timolol decreases plasma high-density lipoprotein cholesterol level. *Archives of ophthalmology* 108: 1260-1263.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5.
- Collison DJ, Duncan G (2001). Regional differences in functional receptor distribution and calcium mobilization in the intact human lens. *Investigative ophthalmology & visual science* 42: 2355-2363.
- Conneely OM (2001). Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr* 20: 389S-395S; discussion 396S-397S.
- Contreras-Ruiz L, Schulze U, Garcia-Posadas L, Arranz-Valsero I, Lopez-Garcia A, Paulsen F, *et al.* (2012). Structural and functional alteration of corneal epithelial barrier under inflammatory conditions. *Current eye research* 37: 971-981.
- Courville CB, Smolek MK, Klyce SD (2004). Contribution of the ocular surface to visual optics. *Experimental eye research* 78: 417-425.
- Cowlen MS, Zhang VZ, Warnock L, Moyer CF, Peterson WM, Yerxa BR (2003). Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization. *Experimental eye research* 77: 77-84.
- Crooke A, Mediero A, Guzman-Aranguez A, Pintor J (2009). Silencing of P2Y2 receptor delays Ap4A-corneal re-epithelialization process. *Molecular vision* 15: 1169-1178.
- Crooke A, Guzman-Aranguez A, Peral A, Abdurrahman MK, Pintor J (2008). Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacology & therapeutics* 119: 55-73.
- Crosson CE, Yates PW, Bhat AN, Mukhin YV, Husain S (2004). Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 309: 484-489.
- Cummins PM (2012). Occludin: one protein, many forms. *Molecular and cellular biology* 32: 242-250.

- Chakravarti S (2006). Focus on molecules: keratocan (KERA). *Experimental eye research* 82: 183-184.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42: 517-525.
- Chang B, Smith RS, Hawes NL, Anderson MG, Zabaleta A, Savinova O, *et al.* (1999). Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nature genetics* 21: 405-409.
- Chen L, Ebihara N, Fujiki K, Murakami A (2007). Expression and distribution of junctional adhesion molecule-1 in the human cornea. *Japanese journal of ophthalmology* 51: 405-411.
- Chen W, Li Z, Hu J, Zhang Z, Chen L, Chen Y, *et al.* (2011). Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit. *PloS one* 6: e26103.
- Chen W, Hu J, Zhang Z, Chen L, Xie H, Dong N, *et al.* (2012). Localization and expression of zonula occludens-1 in the rabbit corneal epithelium following exposure to benzalkonium chloride. *PloS one* 7: e40893.
- Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA (2000). Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* 11: 849-862.
- Cher I (2012). Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics. *Clin Experiment Ophthalmol* 40: 634-643.
- Chou TH, Kocaoglu OP, Borja D, Ruggeri M, Uhlhorn SR, Manns F, *et al.* (2011). Postnatal elongation of eye size in DBA/2J mice compared with C57BL/6J mice: in vivo analysis with whole-eye OCT. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 3604-3612.
- Chow J, Liton PB, Luna C, Wong F, Gonzalez P (2007). Effect of cellular senescence on the P2Y-receptor mediated calcium response in trabecular meshwork cells. *Molecular vision* 13: 1926-1933.
- Danias J, Lee KC, Zamora MF, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, *et al.* (2003). Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 44: 5151-5162.
- Danjo Y, Lee M, Horimoto K, Hamano T (1994). Ocular surface damage and tear lactoferrin in dry eye syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 72: 433-437.
- Davis FA (1929). The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 27: 400 402-441.
- de Lillo A, Quiros LM, Fierro JF (1997). Relationship between antibacterial activity and cell surface binding of lactoferrin in species of genus *Micrococcus*. *FEMS microbiology letters* 150: 89-94.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* 121: 2115-2122.

DelMonte DW, Kim T (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 37: 588-598.

Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* 89: 271-277.

Diamond JM (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20: 10-18.

Ding C, Wang P, Tian N (2011). Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Experimental eye research* 92: 512-520.

Dore-Savard L, Roussy G, Dansereau MA, Collingwood MA, Lennox KA, Rose SD, *et al.* (2008). Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16: 1331-1339.

Doughty MJ (1989). Physiological state of the rabbit cornea following 4 degrees C moist chamber storage. *Experimental eye research* 49: 807-827.

Doughty MJ, Zaman ML (2000). Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol* 44: 367-408.

Doughty MJ, Bergmanson JP, Blocker Y (1997). Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative

compared to glutaraldehyde. *Tissue Cell* 29: 533-547.

Doughty MJ, Seabert W, Bergmanson JP, Blocker Y (2001). A descriptive and quantitative study of the keratocytes of the corneal stroma of albino rabbits using transmission electron microscopy. *Tissue Cell* 33: 408-422.

Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, *et al.* (2008). Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS one* 3: e3931.

Dua HS, Gomes JA, Singh A (1994). Corneal epithelial wound healing. *The British journal of ophthalmology* 78: 401-408.

Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J (2013). Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 120: 1778-1785.

DukeElder SW, KC. (1961). System of Ophthalmology. *The Anatomy of the Visual System*.

Dupps WJ, Jr., Wilson SE (2006). Biomechanics and wound healing in the cornea. *Experimental eye research* 83: 709-720.

Durán de la Colina JA Anatomofisiología de la córnea.
<http://www.oftalmo.com/publicaciones/lecciones/cap1.htm>.

Dutot M, Liang H, Pauloin T, Brignole-Baudouin F, Baudouin C, Warnet JM, *et al.* (2008). Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor. *Molecular vision* 14: 889-897.

Edelhauser HF (2006). The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 1754-1767.

Everitt DE, Avorn J (1990). Systemic effects of medications used to treat glaucoma. *Annals of internal medicine* 112: 120-125.

Fanning AS, Anderson JM (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165: 113-120.

Feldman G, Kiely B, Martin N, Ryan G, McMorrow T, Ryan MP (2007). Role for TGF-beta in cyclosporine-induced modulation of renal epithelial barrier function. *J Am Soc Nephrol* 18: 1662-1671.

Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Advanced drug delivery reviews* 57: 883-917.

Findley MK, Koval M (2009). Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* 61: 431-437.

Fini ME, Stramer BM (2005). How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea* 24: S2-S11.

Fischbarg J, Diecke FP, Iserovich P, Rubashkin A (2006). The Role of the Tight Junction in Paracellular Fluid Transport across Corneal Endothelium. Electro-osmosis as a Driving Force. *J Membr Biol* 210: 117-130.

Flanagan JL, Willcox MD (2009). Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie* 91: 35-43.

Fleming A (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. 21: 463-480.

Flodgaard H, Klenow H (1982). Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *The Biochemical journal* 208: 737-742.

Fonseca B, Martinez-Aguila A, Diaz-Hernandez M, Pintor J (2015). Diadenosine tetraphosphate contributes to carbachol-induced tear secretion. *Purinergic Signal* 11: 87-93.

Foster C.S. A, D., Dohlman, C.H. (2005). Smolin and Thoft's The Cornea; Scientific Foundations and Clinical Practice. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.

Franke H, Klimke K, Brinckmann U, Grosche J, Francke M, Sperlagh B, et al. (2005). P2X(7) receptor-mRNA and -protein in the mouse retina; changes during retinal degeneration in BALB/c mice. *Neurochem Int* 47: 235-242.

Frishman WH, Kowalski M, Nagnur S, Warshafsky S, Sica D (2001). Cardiovascular considerations in using topical, oral, and intravenous drugs for the treatment of glaucoma and ocular hypertension: focus on beta-adrenergic blockade. *Heart disease* 3: 386-397.

Fujihara T, Nagano T, Endo K, Nakamura M, Nakata K (2000). Lactoferrin protects against UV-B irradiation-induced corneal

epithelial damage in rats. *Cornea* 19: 207-211.

Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K (2001). Improvement of corneal barrier function by the P2Y₂ agonist INS365 in a rat dry eye model. *Investigative ophthalmology & visual science* 42: 96-100.

Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW (1997). Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *The Journal of biological chemistry* 272: 28089-28095.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123: 1777-1788.

Garreis F, Gottschalt M, Schlorf T, Glaser R, Harder J, Worlitzsch D, et al. (2011). Expression and regulation of antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) at the ocular surface and in the lacrimal apparatus. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 4914-4922.

Gasmi L, Cartwright JL, McLennan AG (1998). The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I. *Biochimica et biophysica acta* 1405: 121-127.

Geroski DH, Edelhauser HF (2000). Drug delivery for posterior segment eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 41: 961-964.

Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452: 513-537.

Gillette TE, Allansmith MR (1980). Lactoferrin in human ocular tissues. *American journal of ophthalmology* 90: 30-37.

Gipson IK (2007). The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 48: 4390; 4391-4398.

Gipson IK, Argueso P (2003). Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol* 231: 1-49.

Gipson IK, Watanabe H, Zieske JD (1993). Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clin* 33: 149-163.

Goes RM, Barbosa FL, De Faria ESSJ, Haddad A (2008). Morphological and autoradiographic studies on the corneal and limbal epithelium of rabbits. *Anatomical record* 291: 191-203.

Goldman SJ, Gordon EL, Slakey LL (1986). Hydrolysis of diadenosine 5',5''-P',P''-triphosphate (Ap3A) by porcine aortic endothelial cells. *Circulation research* 59: 362-366.

Gomes P, Srinivas SP, Vereecke J, Himpens B (2005). ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 46: 104-113.

- Gonzalez-Mariscal L, Hernandez S, Vega J (2008a). Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2: 145-176.
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008b). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1778: 729-756.
- Groschel-Stewart U, Bardini M, Robson T, Burnstock G (1999). Localisation of P2X5 and P2X7 receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia. *Cell Tissue Res* 296: 599-605.
- Gunter C (2002). The mouse genome: human biology by proxy. *Nature*: 509-511.
- Guo X, Rao JN, Liu L, Zou T, Keledjian KM, Boneva D, et al. (2005). Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 288: G1159-1169.
- Guzman-Aranguez A, Woodward AM, Pintor J, Argueso P (2012a). Targeted disruption of core 1 beta1,3-galactosyltransferase (C1galt1) induces apical endocytic trafficking in human corneal keratinocytes. *PloS one* 7: e36628.
- Guzman-Aranguez A, Crooke A, Peral A, Hoyle CH, Pintor J (2007). Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Progress in retinal and eye research* 26: 674-687.
- Guzman-Aranguez A, Santano C, Martin-Gil A, Fonseca B, Pintor J (2013). Nucleotides in the eye: focus on functional aspects and therapeutic perspectives. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 345: 331-341.
- Guzman-Aranguez A, Diez LM, Martin-Gil A, Gualix J, Miras-Portugal MT, Pintor J (2012b). Effect of diinosine polyphosphates on intraocular pressure in normotensive rabbits. *Experimental eye research* 101: 49-55.
- Gwon A (2008). The Rabbit in Cataract/IOL Surgery. *Animal models in eye research*: 184-204.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2002). Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *The Journal of biological chemistry* 277: 455-461.
- Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE (1961). Cell turnover in the adult human eye. *Archives of ophthalmology* 65: 695-698.
- Hartsock A, Nelson WJ (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778: 660-669.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *The Journal of cell biology* 141: 199-208.

- Hassell JR, Birk DE (2010). The molecular basis of corneal transparency. *Experimental eye research* 91: 326-335.
- Haustein J (1983). On the ultrastructure of the developing and adult mouse corneal stroma. *Anat Embryol (Berl)* 168: 291-305.
- Hazlett LD (1993). Corneal and ocular surface histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 25: 1-60.
- He Z, Campolmi N, Ha Thi BM, Dumollard JM, Peoc'h M, Garraud O, *et al.* (2011). Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Molecular vision* 17: 3494-3511.
- Hemsley S, Cole N, Canfield P, Willcox MD (2000). Protein microanalysis of animal tears. *Res Vet Sci* 68: 207-209.
- Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JP (2009). Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 50: 3648-3654.
- Hodges RR, Vrouvlianis J, Shatos MA, Dartt DA (2009). Characterization of P2X7 purinergic receptors and their function in rat lacrimal gland. *Investigative ophthalmology & visual science* 50: 5681-5689.
- Hodges RR, Vrouvlianis J, Scott R, Dartt DA (2011). Identification of P2X(3) and P2X(7) purinergic receptors activated by ATP in rat lacrimal gland. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 3254-3263.
- Holweg A, Schnare M, Gessner A (2011). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the innate defence of the lower airways. *Biochem Soc Trans* 39: 1045-1050.
- Hornof M, Toropainen E, Urtti A (2005). Cell culture models of the ocular barriers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 60: 207-225.
- Howell GR, Libby RT, Marchant JK, Wilson LA, Cosma IM, Smith RS, *et al.* (2007). Absence of glaucoma in DBA/2J mice homozygous for wild-type versions of Gpnmb and Tyrp1. *BMC genetics* 8: 45.
- Hoyle CH, Pintor JJ (2010). Diadenosine tetraphosphate protects sympathetic terminals from 6-hydroxydopamine-induced degeneration in the eye. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 205-210.
- Hu YJ, Wang YD, Tan FQ, Yang WX (2013). Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Mol Biol Rep* 40: 6123-6142.
- Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR (1989). Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Investigative ophthalmology & visual science* 30: 684-689.
- Huang HS, Schoenwald RD, Lach JL (1983). Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions. *J Pharm Sci* 72: 1272-1279.
- Huet E, Vallee B, Delbe J, Mourah S, Pruliere-Escabasse V, Tremouilleres M, *et al.* (2011). EMMPRIN modulates epithelial barrier function through a MMP-mediated occludin cleavage: implications in dry eye disease. *The American journal of pathology* 179: 1278-1286.

- Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG (2005). Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Advanced drug delivery reviews* 57: 2010-2032.
- Iandiev I, Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P, Reichenbach A, Robson SC, *et al.* (2007). Ectonucleotidases in Muller glial cells of the rodent retina: Involvement in inhibition of osmotic cell swelling. *Purinergic Signal* 3: 423-433.
- Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sugatani J (2011). Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *Journal of cellular physiology* 226: 2448-2456.
- Inagaki E, Hatou S, Yoshida S, Miyashita H, Tsubota K, Shimmura S (2013). Expression and distribution of claudin subtypes in human corneal endothelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 54: 7258-7265.
- Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, *et al.* (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO journal* 15: 1885-1893.
- Itoh M, Bissell MJ (2003). The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 449-462.
- Itoh M, Yonemura S, Nagafuchi A, Tsukita S, Tsukita S (1991). A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *The Journal of cell biology* 115: 1449-1462.
- Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *The Journal of cell biology* 121: 491-502.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* 147: 1351-1363.
- Jacobson KA, Boeynaems JM (2010). P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug discovery today* 15: 570-578.
- Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG (2012). G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal* 8: 419-436.
- Janssen PT, van Bijsterveld OP (1983). Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins. *Investigative ophthalmology & visual science* 24: 623-630.
- Janssens R, Communi D, Piroton S, Samson M, Parmentier M, Boeynaems JM (1996). Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 221: 588-593.
- Jarvinen KJ, T.; Urtti, A. (1995). Ocular absorption following topical delivery. *Drug Delivery Rev* 16: 3-19.

- Jensen OL, Gluud BS, Birgens HS (1985). The concentration of lactoferrin in tears during post-operative ocular inflammation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 63: 341-345.
- Jesaitis LA, Goodenough DA (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *The Journal of cell biology* 124: 949-961.
- Jester JV, Ghee Lee Y, Li J, Chakravarti S, Paul J, Petroll WM, *et al.* (2001). Measurement of corneal sublayer thickness and transparency in transgenic mice with altered corneal clarity using in vivo confocal microscopy. *Vision Res* 41: 1283-1290.
- Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavangh HD, *et al.* (1999). The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *Journal of cell science* 112 (Pt 5): 613-622.
- Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ, Hinton DR (2002). Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Investigative ophthalmology & visual science* 43: 2782-2790.
- John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, *et al.* (1998). Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 39: 951-962.
- Johnson TV, Tomarev SI (2010). Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull* 81: 349-358.
- Jumblatt JE, Jumblatt MM (1998). Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. *Experimental eye research* 67: 341-346.
- Kamada Y, Saino T, Oikawa M, Kurosaka D, Satoh Y (2012). P2Y purinoceptors induce changes in intracellular calcium in acinar cells of rat lacrimal glands. *Histochemistry and cell biology* 137: 97-106.
- Kaneda M, Ito K, Shigematsu Y, Shimoda Y (2010). The OFF-pathway dominance of P2X(2)-purinoceptors is formed without visual experience. *Neurosci Res* 66: 86-91.
- Kao WW, Funderburgh JL, Xia Y, Liu CY, Conrad GW (2006). Focus on molecules: lumican. *Experimental eye research* 82: 3-4.
- Kapus A, Szaszi K (2006). Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochem Cell Biol* 84: 870-880.
- Katz LJ (1999). Brimonidine tartrate 0.2% twice daily vs timolol 0.5% twice daily: 1-year results in glaucoma patients. Brimonidine Study Group. *American journal of ophthalmology* 127: 20-26.
- Kawamura H, Sugiyama T, Wu DM, Kobayashi M, Yamanishi S, Katsumura K, *et al.* (2003). ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol* 551: 787-799.
- Kiel JW, Hollingsworth M, Rao R, Chen M, Reitsamer HA (2011). Ciliary blood flow and aqueous humor production. *Progress in retinal and eye research* 30: 1-17.
- Kijlstra A (1990). The role of lactoferrin in the nonspecific immune response on the ocular surface. *Reg Immunol* 3: 193-197.

Kijlstra A, Kuizenga A (1994). Analysis and function of the human tear proteins. *Adv Exp Med Biol* 350: 299-308.

Kim JH, Kim JH, Jun HO, Yu YS, Kim KW (2010). Inhibition of protein kinase C delta attenuates blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *The American journal of pathology* 176: 1517-1524.

Kimura K (2010). [Molecular mechanism of the disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha, a proinflammatory cytokine]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 114: 935-943.

Kimura K, Teranishi S, Nishida T (2009). Interleukin-1beta-induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 50: 597-603.

Kimura K, Teranishi S, Kawamoto K, Nishida T (2010). Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by hepatocyte growth factor. *Experimental eye research* 90: 337-343.

King BF, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G (1996). Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *British journal of pharmacology* 117: 1371-1373.

Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118: 1001-1011.

Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V (2004). P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *Journal of cellular biochemistry* 93: 1115-1133.

Klingler C, Kniesel U, Bamforth SD, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W (2000). Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochemistry and cell biology* 113: 349-361.

Klishin A, Lozovaya N, Pintor J, Miras-Portugal MT, Krishtal O (1994). Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus. *Neuroscience* 58: 235-236.

Knupp C, Pinali C, Lewis PN, Parfitt GJ, Young RD, Meek KM, *et al.* (2009). The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol* 78: 25-49.

Ko JA, Yanai R, Nishida T (2009). Up-regulation of ZO-1 expression and barrier function in cultured human corneal epithelial cells by substance P. *FEBS Lett* 583: 2148-2153.

Komai Y, Ushiki T (1991). The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Investigative ophthalmology & visual science* 32: 2244-2258.

Kompella UB, Kadam RS, Lee VH (2010). Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Therapeutic delivery* 1: 435-456.

Krachmer JH (2011). *Cornea, fundamentals, diagnosis and management. Chapter 1. Córnea and sclera.* . 3rd ed edn.

Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmari E, *et al.* (2005). Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 25: 129-139.

Lal-Nag M, Morin PJ (2009). The claudins. *Genome Biol* 10: 235.

Lalo U, Pankratov Y, Wichert SP, Rossner MJ, North RA, Kirchhoff F, *et al.* (2008). P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 5473-5480.

Lang JC (1995). Ocular drug-delivery conventional ocular formulations. *Advanced drug delivery reviews* 16: 39. 43.

Laude A, Tan LE, Wilson CG, Lascaratos G, Elashry M, Aslam T, *et al.* (2010). Intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration and inter-individual variations in vitreous pharmacokinetics. *Progress in retinal and eye research* 29: 466-475.

Leal EC, Martins J, Voabil P, Liberal J, Chiavaroli C, Bauer J, *et al.* (2010). Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes. *Diabetes* 59: 2637-2645.

Lee EJ, Evans DJ, Fleiszig SM (2003). Role of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA in penetration through corneal epithelium in a novel in vivo model. *Investigative ophthalmology & visual science* 44: 5220-5227.

Lee JS, Lee JE, Kim N, Oum BS (2008). Comparison of the conjunctival toxicity of topical ocular antiallergic agents. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 24: 557-562.

Leong YY, Tong L (2015). Barrier function in the ocular surface: from conventional paradigms to new opportunities. *Ocul Surf* 13: 103-109.

Leung T, Manser E, Tan L, Lim L (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *The Journal of biological chemistry* 270: 29051-29054.

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and cellular biology* 16: 5313-5327.

Li A, Zhang X, Zheng D, Ge J, Laties AM, Mitchell CH (2011). Sustained elevation of extracellular ATP in aqueous humor from humans with primary chronic angle-closure glaucoma. *Experimental eye research* 93: 528-533.

Li HF, Petroll WM, Moller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV (1997). Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Current eye research* 16: 214-221.

Li HJ, Guo LM, Yang LL, Zhou YC, Zhang YJ, Guo J, *et al.* (2013). Electromagnetic-pulse-induced activation of p38 MAPK pathway and disruption of blood-retinal barrier. *Toxicol Lett* 220: 35-43.

Li W, Vergnes JP, Cornuet PK, Hassell JR (1992). cDNA clone to chick corneal chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan reveals identity to decorin. *Archives of biochemistry and biophysics* 296: 190-197.

Li X, Akhtar S, Choudhry MA (2012). Alteration in intestine tight junction protein phosphorylation and apoptosis is associated with increase in IL-18 levels following alcohol intoxication and burn injury. *Biochimica et biophysica acta* 1822: 196-203.

Libby RT, Anderson MG, Pang IH, Robinson ZH, Savinova OV, Cosma IM, *et al.* (2005). Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Visual neuroscience* 22: 637-648.

Lively GD, Jiang B, Hedberg-Buenz A, Chang B, Petersen GE, Wang K, *et al.* (2010). Genetic dependence of central corneal thickness among inbred strains of mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 51: 160-171.

Loftsson T, Jansook P, Stefansson E (2012). Topical drug delivery to the eye: dorzolamide. *Acta ophthalmologica* 90: 603-608.

Lomaestro BM (2000). Fluoroquinolone-induced renal failure. *Drug safety* 22: 479-485.

Luthje J, Ogilvie A (1983). The presence of diadenosine 5',5'''-P₁P₃-triphosphate (Ap₃A) in human platelets. *Biochemical and biophysical research communications* 115: 253-260.

Ma L, Kuang K, Smith RW, Rittenband D, Iserovich P, Diecke FP, *et al.* (2007). Modulation of tight junction properties relevant to fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Experimental eye research* 84: 790-798.

Mackie IA, Seal DV (1976). Quantitative tear lysozyme assay in units of activity per microlitre. *The British journal of ophthalmology* 60: 70-74.

Mackie IA, Seal DV (1984). Diagnostic implications of tear protein profiles. *The British journal of ophthalmology* 68: 321-324.

Maher GJ, Hilton EN, Urquhart JE, Davidson AE, Spencer HL, Black GC, *et al.* (2011). The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS Lett* 585: 2187-2192.

Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, von Kugelgen I, Jacobson KA (2004). Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P₂Y₆ nucleotide receptors. *Biochemical pharmacology* 67: 1763-1770.

Maminishkis A, Jalickee S, Blaug SA, Rymer J, Yerxa BR, Peterson WM, *et al.* (2002). The P₂Y₂ receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Investigative ophthalmology & visual science* 43: 3555-3566.

Mandell KJ, Holley GP, Parkos CA, Edelhauser HF (2006). Antibody blockade of junctional adhesion molecule-A in rabbit corneal endothelial tight junctions produces corneal swelling. *Investigative*

ophthalmology & visual science 47: 2408-2416.

Mandell KJ, Berglin L, Severson EA, Edelhauser HF, Parkos CA (2007). Expression of JAM-A in the human corneal endothelium and retinal pigment epithelium: localization and evidence for role in barrier function. *Investigative ophthalmology & visual science* 48: 3928-3936.

Mantelli F, Argueso P (2008). Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 8: 477-483.

Markovskaya A, Crooke A, Guzman-Aranguiz AI, Peral A, Ziganshin AU, Pintor J (2008). Hypotensive effect of UDP on intraocular pressure in rabbits. *European journal of pharmacology* 579: 93-97.

Marshall GE, Konstas AG, Lee WR (1991a). Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. II. Collagen types V and VI. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 229: 164-171.

Marshall GE, Konstas AG, Lee WR (1991b). Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 229: 157-163.

Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, et al. (2003). Pharmacological characterization of

the human P2Y₁₃ receptor. *Molecular pharmacology* 64: 104-112.

Martin-Gil A, de Lara MJ, Crooke A, Santano C, Peral A, Pintor J (2012). Silencing of P2Y₂ receptors reduces intraocular pressure in New Zealand rabbits. *British journal of pharmacology* 165: 1163-1172.

Martin-Gil AP, J. (2010). P2Y₂ nucleotide receptors increase the presence of aquaporin-1 in rabbit non pigmented ciliary epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6915.

Martín-Gil.; Pintor J (2010). P2Y₂ nucleotide receptors increase the presence of aquaporin-1 in rabbit non-pigmented ciliary epithelial cells. *Purinerg signal* 6: 155-155.

Masson PL, Heremans JF, Dive C (1966). Studies of the proteins of secretions from two villous tumours of the rectum. *Gastroenterologia* 105: 270-282.

Mateo J, Miras-Portugal MT, Rotllan P (1997a). Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells. *The American journal of physiology* 273: C918-927.

Mateo J, Rotllan P, Marti E, Gomez De Aranda I, Solsona C, Miras-Portugal MT (1997b). Diadenosine polyphosphate hydrolase from presynaptic plasma membranes of Torpedo electric organ. *The Biochemical journal* 323 (Pt 3): 677-684.

Mathew JH, Bergmanson JP, Doughty MJ (2008). Fine structure of the interface between the anterior limiting lamina and the anterior stromal fibrils of the human

cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 49: 3914-3918.

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, *et al.* (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *The EMBO journal* 15: 2208-2216.

Matter K, Balda MS (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 225-236.

Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current opinion in cell biology* 17: 453-458.

Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N, Argueso P (2014). Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *Journal of cell science* 127: 3141-3148.

Mayo C, Ren R, Rich C, Stepp MA, Trinkaus-Randall V (2008). Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 49: 4384-4391.

Mayo KH, Mvele OM, Puri RN (1990). Proton magnetic resonance spectroscopic analysis of diadenosine 5',5'''-polyphosphates. *FEBS Lett* 265: 97-100.

McDermott AM (2013). Antimicrobial compounds in tears. *Experimental eye research* 117: 53-61.

McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW (2009). Mouse models of retinal ganglion

cell death and glaucoma. *Experimental eye research* 88: 816-824.

McMenamin PG SC, McGhee CNJ. (1997). Cornea anatomy, physiology and healing. 41-63.

Mediero A, Peral A, Pintor J (2006). Dual roles of diadenosine polyphosphates in corneal epithelial cell migration. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 4500-4506.

Mediero A, Crooke A, Guzman-Aranguez A, Pintor J (2011). Phospholipase C/Protein Kinase C pathway is essential for corneal re-epithelialization induced by Ap(4)A. *Current eye research* 36: 1108-1115.

Mediero A, Guzman-Aranguez A, Crooke A, Peral A, Pintor J (2008). Corneal re-epithelialization stimulated by diadenosine polyphosphates recruits RhoA/ROCK and ERK1/2 pathways. *Investigative ophthalmology & visual science* 49: 4982-4992.

Mediero AC, A.; Pintor, J. (2010). Diadenosine polyphosphates Ap₄A and Ap₃A, increase epithelial cell proliferation during corneal wound healing. *J Emmetropia* 1.

Merriman-Smith R, Tunstall M, Kistler J, Donaldson P, Housley G, Eckert R (1998). Expression profiles of P2-receptor isoforms P2Y1 and P2Y2 in the rat lens. *Investigative ophthalmology & visual science* 39: 2791-2796.

Meyer CH, Hotta K, Peterson WM, Toth CA, Jaffe GJ (2002). Effect of INS37217, a P2Y(2) receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits. *Investigative*

ophthalmology & visual science 43: 3567-3574.

Millar TJ, Tragoulias ST, Anderton PJ, Ball MS, Miano F, Dennis GR, *et al.* (2006). The surface activity of purified ocular mucin at the air-liquid interface and interactions with meibomian lipids. *Cornea* 25: 91-100.

Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, *et al.* (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 585: 606-612.

Miras-Portugal MT, Gualix J, Mateo J, Diaz-Hernandez M, Gomez-Villafuertes R, Castro E, *et al.* (1999). Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog Brain Res* 120: 397-409.

Miras-Portugal MT, Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Diaz-Hernandez JI, Artalejo AR, Ortega F, *et al.* (2015). Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology*.

Mitchell CH, Carre DA, McGlinn AM, Stone RA, Civan MM (1998). A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7174-7178.

Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, Glotin A, Mascarelli F, Massin P, *et al.* (2007). Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50: 461-470.

Montero J. EF, Benárquez A. Lisoizima lagrimal en queratoconjuntivitis seca. *Arch Soc Españ Oftalmol* 58: 385-390.

Montes-Mico R (2007). Role of the tear film in the optical quality of the human eye. *J Cataract Refract Surg* 33: 1631-1635.

Montezuma SR, Dolezal LD, Rageh AA, Mar K, Jordan M, Ferrington DA (2015). Lactoferrin Reduces Chorioretinal Damage in the Murine Laser Model of Choroidal Neovascularization. *Current eye research* 40: 946-953.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65: 55-63.

Muller LJ, Pels E, Vrensen GF (2001). The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *The British journal of ophthalmology* 85: 437-443.

Muller LJ, Pels E, Schurmans LR, Vrensen GF (2004). A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Experimental eye research* 78: 493-501.

Mun EA, Morrison PW, Williams AC, Khutoryanskiy VV (2014). On the barrier properties of the cornea: a microscopy study of the penetration of fluorescently labeled nanoparticles, polymers, and sodium fluorescein. *Molecular pharmaceutics* 11: 3556-3564.

Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K (2000). P2Y(2) receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Current eye research* 21: 782-787.

Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K (2003). P2Y(2) receptor elicits

PAS-positive glycoprotein secretion from rabbit conjunctival goblet cells in vivo. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 19: 345-352.

Murube J (2012). The origin of tears. II. The mucinic component in the XIX and XX centuries. *Ocul Surf* 10: 126-136.

Nichols KK, Yerxa B, Kellerman DJ (2004). Diquafosol tetrasodium: a novel dry eye therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 13: 47-54.

North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82: 1013-1067.

Notomi S, Hisatomi T, Kanemaru T, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, *et al.* (2011). Critical involvement of extracellular ATP acting on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death. *The American journal of pathology* 179: 2798-2809.

Nour M, Quiambao AB, Peterson WM, Al-Ubaidi MR, Naash MI (2003). P2Y(2) receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 44: 4505-4514.

Novak I, Jans IM, Wohlfahrt L (2010). Effect of P2X(7) receptor knockout on exocrine secretion of pancreas, salivary glands and lacrimal glands. *J Physiol* 588: 3615-3627.

Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, Murata M, *et al.* (2012). Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in

ovarian cancer cell lines. *Histochemistry and cell biology* 138: 323-338.

Ohtomo K, Shatos MA, Vrouvlianis J, Li D, Hodges RR, Dartt DA (2011). Increase of intracellular Ca²⁺ by purinergic receptors in cultured rat lacrimal gland myoepithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 9503-9515.

Ojeda JL, Ventosa JA, Piedra S (2001). The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. *J Anat* 199: 567-576.

Pang IH, Clark AF (2007). Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma* 16: 483-505.

Pattamatta U, Willcox M, Stapleton F, Garrett Q (2013). Bovine lactoferrin promotes corneal wound healing and suppresses IL-1 expression in alkali wounded mouse cornea. *Current eye research* 38: 1110-1117.

Paulsen FP, Berry MS (2006). Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. *Prog Histochem Cytochem* 41: 1-53.

Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM (2001). Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* 20: 385-414.

Peral A, Gallar J, Pintor J (2009). Adenine nucleotide effect on intraocular pressure: Involvement of the parasympathetic nervous system. *Experimental eye research* 89: 63-70.

Peral A, Carracedo G, Acosta MC, Gallar J, Pintor J (2006). Increased levels of

diadenosine polyphosphates in dry eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 4053-4058.

Perez de Lara MJ, Santano C, Guzman-Arangué A, Valiente-Soriano FJ, Aviles-Trigueros M, Vidal-Sanz M, et al. (2014). Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Experimental eye research* 122: 40-49.

Peris C (2014). Microscopía de la córnea sana: correlación con la córnea ectásica. 25-34.

Petecchia L, Sabatini F, Usai C, Caci E, Varesio L, Rossi GA (2012). Cytokines induce tight junction disassembly in airway cells via an EGFR-dependent MAPK/ERK1/2-pathway. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92: 1140-1148.

Peters CW, Kruse U, Pollwein R, Grzeschik KH, Sippel AE (1989). The human lysozyme gene. Sequence organization and chromosomal localization. *European journal of biochemistry / FEBS* 182: 507-516.

Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS (1997). Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17: 2324-2337.

Petroll WM, Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD (1996). Effects of basic FGF and TGF beta 1 on F-actin and ZO-1 organization during cat endothelial wound healing. *Cornea* 15: 525-532.

Peuravuori H, Aho VV, Aho HJ, Collan Y, Saari KM (2006). Bactericidal/permeability-increasing protein in lacrimal gland and in tears of healthy subjects. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 244: 143-148.

Pinard CL, Weiss ML, Brightman AH, Fenwick BW, Davidson HJ (2003). Evaluation of lysozyme and lactoferrin in lacrimal and other ocular glands of bison and cattle and in tears of bison. *Am J Vet Res* 64: 104-108.

Pintor J (2005). Adenine nucleotides and dinucleotides as new substances for the treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Curr Opin Investig Drugs* 6: 76-80.

Pintor J (2007). [A molecular marker for dry eye]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 82: 129-130.

Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT (1991). Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life sciences* 48: 2317-2324.

Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M, Miras-Portugal MT (1992). Presence of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neuroscience letters* 136: 141-144.

Pintor J, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A (2003a). Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT₃ receptor. *British journal of pharmacology* 138: 831-836.

Pintor J, Bautista A, Carracedo G, Peral A (2004a). UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalmic Physiol Opt* 24: 186-193.

Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A (2001). Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *European journal of pharmacology* 416: 251-254.

Pintor J, Carracedo G, Alonso MC, Bautista A, Peral A (2002a). Presence of diadenosine polyphosphates in human tears. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 443: 432-436.

Pintor J, Peral A, Pelaez T, Martin S, Hoyle CH (2003b). Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304: 342-348.

Pintor J, Sanchez-Nogueiro J, Irazu M, Mediero A, Pelaez T, Peral A (2004b). Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. *Purinergic Signal* 1: 83-90.

Pintor J, Peral A, Hoyle CH, Redick C, Douglass J, Sims I, *et al.* (2002b). Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300: 291-297.

Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, Gain P, Nicolas M, Majo F (2013). ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. *PloS one* 8: e62095.

Pivorun EB, Nordone A (1996). Brain synaptosomes display a diadenosine tetraphosphate (Ap4A)-mediated Ca²⁺ influx distinct from ATP-mediated influx. *Journal of neuroscience research* 44: 478-489.

Poole CA, Brookes NH, Clover GM (2003). Confocal imaging of the human keratocyte network using the vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Clin Experiment Ophthalmol* 31: 147-154.

Prager EM (1996). Adaptive evolution of lysozyme: changes in amino acid sequence, regulation of expression and gene number. *EXS* 75: 323-345.

Prager EM, Jolles P (1996). Animal lysozymes c and g: an overview. *EXS* 75: 9-31.

Prince J (1964). The Rabbit in Eye Research. 86-134.

Puthussery T, Fletcher E (2009). Extracellular ATP induces retinal photoreceptor apoptosis through activation of purinoceptors in rodents. *J Comp Neurol* 513: 430-440.

Qasba PK, Kumar S (1997). Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 255-306.

Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK (2010). Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull* 81: 198-210.

Quigley HA, Broman AT (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *The British journal of ophthalmology* 90: 262-267.

Rageh AA, Ferrington DA, Roehrich H, Yuan C, Terluk MR, Nelson EF, *et al.* (2015). Lactoferrin Expression in Human and Murine Ocular Tissue. *Current eye research*: 1-7.

Rahman MQ, Ramaesh K, Montgomery DM (2010). Brimonidine for glaucoma. *Expert opinion on drug safety* 9: 483-491.

Rajashekhar G, Shivanna M, Kompella UB, Wang Y, Srinivas SP (2014). Role of MMP-9 in the breakdown of barrier integrity of the corneal endothelium in response to TNF-alpha. *Experimental eye research* 122: 77-85.

Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50: 413-492.

Ramachandran C, Srinivas SP (2010). Formation and disassembly of adherens and tight junctions in the corneal endothelium: regulation by actomyosin contraction. *Investigative ophthalmology & visual science* 51: 2139-2148.

Ramos A, Pintor J, Miras-Portugal MT, Rotllan P (1995). Use of fluorogenic substrates for detection and investigation of ectoenzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates: a fluorometric study on chromaffin cells. *Analytical biochemistry* 228: 74-82.

Ranta VP, Urtti A (2006). Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling. *Advanced drug delivery reviews* 58: 1164-1181.

Rapacz P, Tedesco J, Donshik PC, Ballow M (1988). Tear lysozyme and lactoferrin levels in giant papillary conjunctivitis and vernal

conjunctivitis. *The CLAO journal : official publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc* 14: 207-209.

Rehbinder C (1978). Fine structure of the mouse cornea. *Z Versuchstierkd* 20: 28-34.

Relvas LJ, Bouffieux C, Marcet B, Communi D, Makhoul M, Horckmans M, *et al.* (2009). Extracellular nucleotides and interleukin-8 production by ARPE cells: potential role of danger signals in blood-retinal barrier activation. *Investigative ophthalmology & visual science* 50: 1241-1246.

Rhodes JD, Collison DJ, Duncan G (2003). Calcium activates SK channels in the intact human lens. *Investigative ophthalmology & visual science* 44: 3927-3932.

Riau AK, Tan NY, Angunawela RI, Htoon HM, Chaurasia SS, Mehta JS (2012). Reproducibility and age-related changes of ocular parametric measurements in rabbits. *BMC veterinary research* 8: 138.

Riley MV, Winkler BS, Peters MI, Czajkowski CA (1994). Relationship between fluid transport and in situ inhibition of Na(+)-K+ adenosine triphosphatase in corneal endothelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 35: 560-567.

Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, *et al.* (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452: 486-500.

Rodriguez-Pascual F, Torres M, Rotllan P, Miras-Portugal MT (1992). Extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates, ApnA, by bovine chromaffin cells in culture.

Archives of biochemistry and biophysics 297: 176-183.

Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT (1988). Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *Journal of neurochemistry* 51: 1696-1703.

Rufer F, Schroder A, Erb C (2005). White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* 24: 259-261.

Ryeom SW, Paul D, Goodenough DA (2000). Truncation mutants of the tight junction protein ZO-1 disrupt corneal epithelial cell morphology. *Molecular biology of the cell* 11: 1687-1696.

Sack RA, Nunes I, Beaton A, Morris C (2001). Host-defense mechanism of the ocular surfaces. *Biosci Rep* 21: 463-480.

Sanderson J, Dartt DA, Trinkaus-Randall V, Pintor J, Civan MM, Delamere NA, *et al.* (2014). Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Muller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland. *Experimental eye research* 127: 270-279.

Santagati MG, La Terra Mule S, Amico C, Pistone M, Rusciano D, Enea V (2005). Lactoferrin expression by bovine ocular surface epithelia: a primary cell culture model to study lactoferrin gene promoter activity. *Ophthalmic research* 37: 270-278.

Schulz D, Iliev ME, Frueh BE, Goldblum D (2003). In vivo pachymetry in normal eyes

of rats, mice and rabbits with the optical low coherence reflectometer. *Vision Res* 43: 723-728.

Schwartz MT, Calvert JF (1990). Potential neurologic toxicity related to ciprofloxacin. *DICP : the annals of pharmacotherapy* 24: 138-140.

Shaheen BS, Bakir M, Jain S (2014). Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol* 59: 263-285.

Sheldon WG, Warbritton AR, Bucci TJ, Turturro A (1995). Glaucoma in food-restricted and ad libitum-fed DBA/2N mice. *Laboratory animal science* 45: 508-518.

Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, *et al.* (2013). TNF-alpha disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Experimental eye research* 110: 59-69.

Shivanna M, Srinivas SP (2010). Elevated cAMP opposes (TNF-alpha)-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium. *Molecular vision* 16: 1781-1790.

Silberberg SD, Chang TH, Swartz KJ (2005). Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *The Journal of general physiology* 125: 347-359.

Smith R (2002). Systematic Evaluation of the Mouse Eye.

Society TFOS (2007). Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of

the International Dry Eye Workshop, DEWS. *Ocul Surf* 5: 179-193.

Song J, Lee YG, Houston J, Petroll WM, Chakravarti S, Cavanagh HD, *et al.* (2003). Neonatal corneal stromal development in the normal and lumican-deficient mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 44: 548-557.

Sosnova-Netukova M, Kuchynka P, Forrester JV (2007). The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes. *The British journal of ophthalmology* 91: 372-378.

Soto D, Pintor J, Peral A, Gual A, Gasull X (2005). Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314: 1042-1051.

Spurr-Michaud S, Argueso P, Gipson I (2007). Assay of mucins in human tear fluid. *Experimental eye research* 84: 939-950.

Srinivas SP, Mutharasan R, Fleiszig S (2002). Shear-induced ATP release by cultured rabbit corneal epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 506: 677-685.

Srinivas SP, Yeh JC, Ong A, Bonanno JA (1998). Ca²⁺ mobilization in bovine corneal endothelial cells by P₂ purinergic receptors. *Current eye research* 17: 994-1004.

Srinivas SP, Satpathy M, Gallagher P, Lariviere E, Van Driessche W (2004). Adenosine induces dephosphorylation of myosin II regulatory light chain in cultured

bovine corneal endothelial cells. *Experimental eye research* 79: 543-551.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of cell biology* 103: 755-766.

Storrs CH, Silverstein SJ (2007). PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *Journal of virology* 81: 4080-4090.

Stuart RO, Sun A, Bush KT, Nigam SK (1996). Dependence of epithelial intercellular junction biogenesis on thapsigargin-sensitive intracellular calcium stores. *The Journal of biological chemistry* 271: 13636-13641.

Sugiyama T, Kawamura H, Yamanishi S, Kobayashi M, Katsumura K, Puro DG (2005). Regulation of P2X₇-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels. *American journal of physiology. Cell physiology* 288: C568-576.

Swarbick J (2001). Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists. 329-353.

Syed NIK, Ch. (2012). Pharmacology of P2X receptors. *WIREs Membr Transp Signal* 2012, 1:16-30. doi: 10.1002/wmts.1.

Tan X, Egami H, Abe M, Nozawa F, Hirota M, Ogawa M (2005). Involvement of MMP-7 in invasion of pancreatic cancer cells through activation of the EGFR mediated

- MEK-ERK signal transduction pathway. *J Clin Pathol* 58: 1242-1248.
- Thoft RA, Friend J (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative ophthalmology & visual science* 24: 1442-1443.
- Thrimawithana TR, Young S, Bunt CR, Green C, Alany RG (2011). Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug discovery today* 16: 270-277.
- To CH, Kong CW, Chan CY, Shahidullah M, Do CW (2002). The mechanism of aqueous humor formation. *Clin Exp Optom* 85: 335-349.
- Toris CB, Gleason ML, Camras CB, Yablonski ME (1995). Effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Archives of ophthalmology* 113: 1514-1517.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- Tragoulas ST, Anderton PJ, Dennis GR, Miano F, Millar TJ (2005). Surface pressure measurements of human tears and individual tear film components indicate that proteins are major contributors to the surface pressure. *Cornea* 24: 189-200.
- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, *et al.* (2002). The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *The Journal of biological chemistry* 277: 10201-10208.
- Tsubota K, Hata S, Okusawa Y, Egami F, Ohtsuki T, Nakamori K (1996). Quantitative videographic analysis of blinking in normal subjects and patients with dry eye. *Archives of ophthalmology* 114: 715-720.
- Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27: 6930-6938.
- Uckermann O, Wolf A, Kutzera F, Kalisch F, Beck-Sickinger AG, Wiedemann P, *et al.* (2006). Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y. *Journal of neuroscience research* 83: 538-550.
- Urtti A (2006). Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 58: 1131-1135.
- Usatyuk PV, Parinandi NL, Natarajan V (2006). Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins. *The Journal of biological chemistry* 281: 35554-35566.
- Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355: 830-833.
- van Bijsterveld OP (1969). Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Archives of ophthalmology* 82: 10-14.
- van Bijsterveld OP (1974). Standardization of the lysozyme test for a commercially available medium. Its use for the diagnosis

- of the sicca syndrome. *Archives of ophthalmology* 91: 432-434.
- Versura P, Bavelloni A, Grillini M, Fresina M, Campos EC (2013). Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye. *Molecular vision* 19: 1247-1257.
- Versura P, Nanni P, Bavelloni A, Blalock WL, Piazzini M, Roda A, *et al.* (2010). Tear proteomics in evaporative dry eye disease. *Eye* 24: 1396-1402.
- Vessey KA, Fletcher EL (2012). Rod and cone pathway signalling is altered in the P2X7 receptor knock out mouse. *PloS one* 7: e29990.
- Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H (2003). Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *European journal of biochemistry / FEBS* 270: 2971-2978.
- von Kugelgen I (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics* 110: 415-432.
- von Kugelgen I, Harden TK (2011). Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv Pharmacol* 61: 373-415.
- Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K (2004). Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy. *Mutation research* 567: 71-84.
- Waldo GL, Harden TK (2004). Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Molecular pharmacology* 65: 426-436.
- Wang WH, Millar JC, Pang IH, Wax MB, Clark AF (2005). Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Investigative ophthalmology & visual science* 46: 4617-4621.
- Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS (2004). Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Experimental eye research* 78: 125-136.
- Ward MM, Puthussery T, Fletcher EL (2008). Localization and possible function of P2Y(4) receptors in the rodent retina. *Neuroscience* 155: 1262-1274.
- Watanabe K, Chiou GC (1983). Action mechanism of timolol to lower the intraocular pressure in rabbits. *Ophthalmic research* 15: 160-167.
- Watanabe T, Umehara T, Kohara M (2007). Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Advanced drug delivery reviews* 59: 1263-1276.
- Weinreb RN, Lindsey JD (2005). The importance of models in glaucoma research. *J Glaucoma* 14: 302-304.
- Westkaemper RB (1987). A proton magnetic resonance study of the effects of polyamine and divalent metal ions on diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate base stacking. *Biochemical and biophysical research communications* 144: 922-929.
- Wiley L, SundarRaj N, Sun TT, Thoft RA (1991). Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an

immunohistochemical evaluation. *Investigative ophthalmology & visual science* 32: 594-602.

Wilson CG (2004). Topical drug delivery in the eye. *Experimental eye research* 78: 737-743.

Wilson SE, Hong JW (2000). Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* 19: 417-420.

Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7834-7838.

Wu J, Helftenbein G, Koslowski M, Sahin U, Tureci O (2006). Identification of new claudin family members by a novel PSI-BLAST based approach with enhanced specificity. *Proteins* 65: 808-815.

Wurm A, Lipp S, Pannicke T, Linnertz R, Krugel U, Schulz A, et al. (2010). Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells. *Journal of neurochemistry* 112: 1261-1272.

Yanai R, Ko JA, Nomi N, Morishige N, Chikama T, Hattori A, et al. (2009). Upregulation of ZO-1 in cultured human corneal epithelial cells by a peptide (PHSRN) corresponding to the second cell-binding site of fibronectin. *Investigative ophthalmology & visual science* 50: 2757-2764.

Yang R, Harada T, Li J, Uchiyama T, Han Y, Englert JA, et al. (2005). Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism. *Intensive Care Med* 31: 709-717.

Ye J, Tsukamoto T, Sun A, Nigam SK (1999). A role for intracellular calcium in tight junction reassembly after ATP depletion-repletion. *The American journal of physiology* 277: F524-532.

Yi X, Wang Y, Yu FS (2000). Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Investigative ophthalmology & visual science* 41: 4093-4100.

Yin J, Yu FS (2008). Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. *American journal of physiology. Cell physiology* 295: C378-387.

Yin Z, Pintea V, Lin Y, Hammock BD, Watsky MA (2011). Vitamin D enhances corneal epithelial barrier function. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 7359-7364.

Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S (2009). Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 50: 2103-2108.

Zeng L, Webster SV, Newton PM (2012). The biology of protein kinase C. *Adv Exp Med Biol* 740: 639-661.

Zhang EP, Schrunder S, Hoffmann F (1996). Orthotopic corneal transplantation in the mouse--a new surgical technique with minimal endothelial cell loss. *Graefes*

archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie 234: 714-719.

Zhang M, Budak MT, Lu W, Khurana TS, Zhang X, Laties AM, *et al.* (2006). Identification of the A3 adenosine receptor in rat retinal ganglion cells. *Molecular vision* 12: 937-948.

Zhang X, Li A, Ge J, Reigada D, Laties AM, Mitchell CH (2007). Acute increase of intraocular pressure releases ATP into the anterior chamber. *Experimental eye research* 85: 637-643.

Zhao W, Xu Y, Kong D, Liu R, Zhang Z, Jin C, *et al.* (2009). Tissue-selective RNA

interference in prostate cancer cell using prostate specific membrane antigen promoter/enhancer. *Urologic oncology* 27: 539-547.

Zhou X, Li F, Kong L, Tomita H, Li C, Cao W (2005). Involvement of inflammation, degradation, and apoptosis in a mouse model of glaucoma. *The Journal of biological chemistry* 280: 31240-31248.

Zimmermann H, Volkhardt W, Wittich B, Hausinger A (1993). Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *Journal of physiology, Paris* 87: 159-170.

Anexo

ANEXO

ARTÍCULOS

- ✓ Peral, M.A.; **Loma, P**; Yerxa, B.; Pintor, J.J. "Topical application of nucleotides increase lysozyme levels in tears". Clin Ophthalmol. 2008 Jun; 2(2): 261–267.
- ✓ Peláez T., Mediero A., Alarma-Estrany P., **Loma P.**, Guzmán Aránguez, A.I., Crooke A., Colligris B., Peral A., Pintor J.. "Melatonin Makes me Feel Awake! Seven Years of Lab Experience". Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia .73 (4), 947-962. 2007.
- ✓ Guzmán Aránguez, A.I.; **Loma, P.**; Pintor, J. "Focus on Molecules: Diadenosine tetraphosphate". Experimental Eye Research. 2011 Feb; 92(2): 96-7.
- ✓ Guzmán Aránguez, A.I.; **Loma, P.**; Pintor, J. "Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy". British Journal of Pharmacology. 2013 Oct; 170(4): 730–747.
- ✓ Carracedo, G; Guzmán Aránguez, A.I.; **Loma, P.**; Pintor, J. "Diadenosine polyphosphates release by human corneal epithelium". Experimental Eye Research. 2013 Aug; 113: 156-61.
- ✓ **Loma, P.**, Guzmán Aránguez, A.I., Pérez de Lara, M.J., Pintor, J. "Diadenosine tetraphosphate improves adrenergic anti-glaucomatous drug delivery and efficiency". Experimental Eye Research. 2015 May; 134: 141-7.
- ✓ **Loma, P.**, Guzmán Aránguez, A.I., Pérez de Lara, M.J., Pintor, J. "Diadenosine tetraphosphate induces tight junction disassembly increasing corneal epithelial permeability". British Journal of Pharmacology. 2015 Feb; 172(4):1045-58.

- ✓ **Loma, P.**, Guzmán Aránguez, A.I., Pérez de Lara, M.J., Pintor, J. "Lactoferrin levels in tears are increased by the topical application of diadenosine tetraphosphate". Current Eye Research.

EN PREPARACIÓN

- ✓ **Loma, P.**, Guzmán Aránguez, A.I., Pérez de Lara, M.J., Martínez-Aguila A., Pintor, J. "Beta 2-adrenergic receptor silencing as an approach for glaucoma treatment".

COMUNICACIONES Y CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

- ✓ Peral, A., **Loma, P.**, Gonzalez, S., Yerxa, B., Pintor, J. "P2 receptors increase lysozyme levels in New Zealand white rabbits. European Association for Vision and Eye Research (E.V.E.R.)". Alicante, España. 2003.
- ✓ Peral, A., **Loma, P.**, Mediero, A., Sesto, A., Pintor, J., Jiménez, A.I. "Effect of Several siRNA in the Treatment of Ocular Hypertension and Glaucoma. Association for Research in Vision and Ophthalmology". Fort Lauderdale, Florida, USA. 2007.
- ✓ Peral, A., G. Carracedo, G., **Loma, P.**, Domínguez, C.O., Pintor, J. "Ap₄A as Molecular Marker in the Severity of Systematic Pathologies Associated with Dry Eye". Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, Florida, USA. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008.

-
- ✓ Jimenez, A.I., Sesto, A., Pintor J., Mediero A., **Loma, P.** Peral A. "A New Therapeutic Candidate for Treating Ocular Hypertension Using RNAi Technology". Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008 49. Fort Lauderdale, Florida, USA (USA). 2008.
 - ✓ Jiménez, A. Mediero, A. **Loma, P.** Pintor, J., Peral, A. y González, V. "Efficacy of Topically Administered siRNAs in Glaucoma Treatment: In vivo Results in Hipertensive Model". Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, Florida, USA. 2009.
 - ✓ Carracedo, G.; Guzmán Aránguez, A.I.; **Loma, P.**; Pintor, J.J. "Ap₄A and Ap₅A are released by the corneal epithelium". Tarragona (España). Purines 2010 meeting.
 - ✓ Guzmán Aránguez, A.I., **Loma, P.**, Pintor, J. "Ap₄A increases corneal epithelial permeability". Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics (AOPT). Alicante, España. 2013.
 - ✓ **Loma, P.**, Pérez de Lara, M.J., Pintor, J. "Ap₄A increases corneal epithelial permeability inducing tight junction disassembly". Purines, Bonn, Alemania. 2014.
 - ✓ **Loma, P.**, Ortin, J.; Pintor, J. "Effect of diadenosine tetraphosphate and PPADS in an animal model of dwarfism". Purines, Bonn, Alemania. 2014.
 - ✓ Guzmán Aránguez, A.I., **Loma, P.**, Pérez de Lara, M.J., Pintor, J. "Diadenosine tetraphosphate modifies corneal epithelial tight junction assembly and barrier permeability". Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, Florida, USA. 2015.

PATENTES

- ✓ Pintor Just, J.; Guzman Aranguez, A.; **Loma, P.** Mejora en la aplicación tópica de fármacos oculares mediante la administración de nucleótidos. N. de solicitud: P201201248. OcuPharm Diagnostics S.L.

- ✓ Pintor Just, J.; Guzman Aranguez, A.; **Loma, P.** Pérez De Lara, M.; Martín Gil, A.; Castro Burgarin, A. Uso del compuesto 2,5-dihidroxibencenosulfonato de calcio (calcio dobesilato) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la acondroplasia. N. de solicitud: P201300662. OcuPharm Diagnostics S.L.